

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en  
cannabinoides para el tratamiento de la Esclerosis Lateral  
Amiotrófica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Laura García Toscano**

DIRECTORES

**Eva de Lago Femia**  
**José Javier Fernández Ruiz**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en  
cannabinoides para el tratamiento de la Esclerosis Lateral  
Amiotrófica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura García Toscano

DIRECTOR

Eva de Lago Femia  
José Javier Fernández Ruiz



Desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en cannabinoides  
para el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica

Laura García Toscano

Universidad Complutense de Madrid  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

# Desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en cannabinoides para el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica

TESIS DOCTORAL

Laura García Toscano

Bajo la dirección de:

Dra. Eva de Lago Femia  
Dr. José Javier Fernández Ruiz

ENERO 2021









*“Au milieu de l’hiver, j’apprenais enfin qu’il y avait en moi un été invincible.”*

[En medio del invierno, aprendí por fin que había en mí un verano invencible.]

Albert Camus. *El verano* (1950)

“Me da vértigo el punto muerto, y la marcha atrás.

Vivir en los atascos, los frenos automáticos, el olor a gasoil.

Me angustia el cruce de miradas, la doble dirección de las palabras, y el obsceno guiar de los semáforos.

Me arruinan las prisas. Y las faltas de estilo. El paso obligatorio, las tardes de domingo, y hasta la línea recta.

Me enervan los que no tienen dudas.

Y aquellos que se aferran a sus ideales por encima de los de cualquiera.

Me cansa tanto tráfico y tanto sin sentido. Parado frente al mar, mientras el mundo gira.”

Extremoduro. *Standby*





*A mis padres, Montse y Chus. Y a mis  
hermanos, Ana, Bárbara y Miguel.  
Por la guerra que os he dado.*





*A Guille, por todas las sonrisas  
que dibujaste.*









# ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

Aa: Aminoácido

ABHD4: alfa-beta hidrolasa de dominio 4

AC: adenilato ciclasa

ACEA: araquidonoil-2-cloroetilamida

ACh: acetilcolina

AChE: acetil colinesterasa

ACPA: araquidonoilciclopropilamida

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AEA: Araquidonoiletanolamida

AITs: transportadores intracelulares de AEA

AMPA: ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPc: adenosin monofosfato cíclico

ANOVA: análisis de la varianza

AraG: Araquidonoilglicina

AraS: Araquidonoil serina

Arg1: Arginasa 1

ARN: ácido ribonucleico

BCHE: butiril colinesterasa

BCP:  $\beta$ -cariofileno

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

BHE: barrera hematoencefálica

BSA: albúmina de suero bovino

CAPN: calpaína

CB1: receptor cannabinoide de tipo 1

CB2: receptor cannabinoide de tipo 2

CBD: cannabidiol

CBDA: ácido cannabidiólico

CBDV: cannabidivarina

CBG: cannabigerol

CBGA: ácido cannabigerólico

CBGV: cannabigerovarina

CBN: cannabinol

ChAT: Colina acetiltransferasa

CK1: caseína quinasa 1

CK2: caseína quinasa 2

COX: ciclooxigenasa

COX-2: ciclooxigenasa 2

DAGL: diacilglicerol lipasa

DFT: demencia frontotemporal

DGC: Complejo distrobrevina

DMEM: Dubelcco's Modified Eagle's

DMSO: dimetilsulfóxido

DPBS: (Del inglés "Dulbecco's Phosphate buffered saline")

E. coli: *Escherichia coli*

EAAT2: transportador 2 de aminoácidos excitadores

EC: Endocannabinoide

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

ELAE: ELA esporádica

ELAF: ELA familiar

EMN: enfermedades de la motoneurona



|   |  |
|---|--|
| END: enfermedades neurodegenerativas                    | MAGL: monoacilglicerol lipasa                                      |
| EO: estrés oxidativo                                    | MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno                       |
| FAAH: Amida hidrolasa de ácidos grasos                  | MCT: receptores de monoxicarbonilato                               |
| FABP: proteínas de unión a ácidos grasos                | mGluR: receptores metabotrópicos de glutamato                      |
| FBS: (del inglés “Fetal Bovine serum”)                  | MN: motoneurona  |
| FDA: (Del inglés “US Food and Drug Administration”)     | RNAmmy: ARN mensajero  |
| FUS: (Del inglés “Fused in Sarcoma”)                    | mtCB <sub>1</sub> : receptor CB1 mitocondrial                      |
| GABA: ácido γ-aminobutírico                             | MYF5: factor miogénico 5   |
| GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa          | MYF6: factor miogénico 6   |
| GDE1: glicerol-fosfodiesterasa 1                        | NAAA: N-aciletanolamina hidrolizante de ácido amidasa              |
| GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía           | NAEs: N-aciletanolamina  |
| GFAP: (Del inglés “Glial fibrillary acidic protein”)    | NAGly: N-araquidonoil-glicina                                      |
| GPCRs: receptores acoplados a proteínas G               | NAPE: N-araquidonoil fosfatidiletanolamina                         |
| GP-NAE: Glicerolfosfo-N-aciletanolamina                 | NAPE-PLD: N-acil fosfatidiletanolamina específica de fosfolipasa D |
| GSR: glutatión reductasa                                | NES: Señal de exportación nuclear                                  |
| HAEA: hidroxianandamida                                 | NFKβ: factor nuclear kappa B                                       |
| HRP: (Del inglés “horseradish peroxidase”)              | NGM: medio de crecimiento de nemátodos                             |
| I.P.: Intraperitoneal                                   | NIH: (Del inglés “National Institute of Health”)                   |
| Iba-1: molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 | NMDA: N-metil-D-aspartato  |
| IL10: interleucina 10                                   | NLS: Señal de localización nuclear                                 |
| IL-1β: interleucina-1β                                  | NO: Óxido nítrico  |
| IL-6: interleucina 6                                    | NT: neurotransmisor  |
| iNOS/NOS2: óxido nítrico sintasa inducible              | OEA: oleoiletanolamida   |
| LBHI: (Del inglés “Lewy body-like hyaline inclusion”)   | pAEA: fosfo-anandamida   |
| LC: regiones de baja complejidad                        | PAS: (Del inglés “Periodic Acid-Schiff”)                           |
| LCR: líquido cefalorraquídeo                            | PB: cuerpos de procesamiento                                       |
| LEA: linoleoiletanolamida                               | PBS: tampón fosfato salino   |
| LME: L-leucine metil éster                              | PCR: reacción en cadena de la polimerasa                           |
| LOX: lipooxigenasa                                      | PEA: palmitoiletanolamida  |
| LPS: lipopolisacárido                                   | PFA: paraformaldehído  |
| LTD: depresión a largo plazo                            | PGE2: prostaglandina E2  |

|   |   |
|---|---|
| PG-EA: prostamidas  | TDP43: (Del inglés “transactive response DNA binding protein 43”)       |
| PG-GE: prostaglandina gliceril éster                                      | TGF-β: factor de crecimiento transformante β                            |
| PIP2: fosfatidil inositol bifosfato                                       | TH: tirosina hidroxilasa  |
| PPAR: receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas    | TLR: (Del inglés “Toll-like receptor”)                                  |
| PTPN22: (Del inglés “Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22”) | TNFα: Factor de necrosis tumoral α                                      |
| PTX: toxina pertussis   | TRP: (Del inglés “Transient receptor potential”)                        |
| PVDF: difloururo de polivinilo  | TRPA: TRP de anquirina  |
| qPCR: PCR cuantitativa  | TRPC: TRP canónicos   |
| RBP: Proteínas de unión a ARN   | TRPM: TRP de melastatina  |
| RE: retículo endoplasmático   | TRPN: TRP no mecanorreceptor  |
| RNS: especies reactivas de nitrógeno                                      | TRPV: TRP vanilloide  |
| ROS: especies reactivas de oxígeno  | UNM: unión neuromuscular  |
| RRM: motivo de reconocimiento de ARN                                      | UPS: sistema de ubiquitin-proteosoma                                    |
| RT-: retrotranscriptasa negativa  | WB: western blot  |
| RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa     | WT: wildtype  |
| SCA2: ataxia espinocerebelosa de tipo 2                                   | Δ <sup>9</sup> -THCA: ácido Δ <sup>9</sup> -tetrahidrocannabinólico     |
| SDS: dodecilsulfato sódico  | Δ <sup>9</sup> - THCVA: ácido Δ <sup>9</sup> -tetrahidrocannabivarínico |
| SEC: sistema cannabinoide endógeno  | Δ <sup>9</sup> -THC: Δ <sup>9</sup> -tetrahidrocannabinol               |
| SG: gránulos de estrés (Del inglés “stress granules”)                     | Δ <sup>9</sup> -THCV: Δ <sup>9</sup> -tetrahidrocannabivarina           |
| SNC: Sistema Nervioso Central   |   |
| SNM: Sinapsis neuromuscular   |   |
| SNP: Sistema Nervioso Periférico  |   |
| SOD: superóxido dismutasa   |   |
| SSEC: Sistema de señalización de tipo endocannabinoide                    |   |
| STP: plasticidad a corto plazo  |   |
| TARDBP: Proteína de unión a ADN de tipo transactivo                       |   |
| TBE: Tampón Tris, borato, EDTA  |   |
| TBS: solución salina tamponada con Tris                                   |   |
| TBS-T: TBS-Tween20  |   |



# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN/SUMMARY .....</b>                              | <b>29</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>                                 | <b>47</b> |
| <b>Esclerosis Lateral Amiotrófica .....</b>               | <b>49</b> |
| Aspectos generales.....                                   | 49        |
| Tipos de ELA: Sistemas de clasificación .....             | 51        |
| Etiología .....   | 53        |
| Mutaciones en el gen SOD1 .....                           | 54        |
| Mutaciones en el gen TARDBP .....                         | 54        |
| Mutaciones en el gen FUS .....                            | 57        |
| Fisiopatología de la ELA .....                            | 59        |
| Disfunción mitocondrial.....                              | 59        |
| Estrés Oxidativo .....                                    | 60        |
| Excitotoxicidad.....                                      | 61        |
| Neuroinflamación .....                                    | 63        |
| Agregación proteica en el citoplasma .....                | 66        |
| Defectos en el procesamiento y estabilidad del ARN .....  | 68        |
| Alteraciones en el transporte axonal.....                 | 69        |
| Alteraciones musculares.....                              | 70        |
| Modelización de la enfermedad .....                       | 71        |
| Modelos murinos basados en el gen SOD1.....               | 73        |
| Modelos murinos basados en el gen TARDBP.....             | 73        |
| Modelos murinos basados en otras mutaciones .....         | 74        |
| <b>Introducción a los cannabinoides .....</b>             | <b>75</b> |
| <b>Sistema Cannabinoide Endógeno .....</b>                | <b>77</b> |
| Receptores celulares .....                                | 77        |
| Receptor Cannabinoide de tipo 1 (CB <sub>1</sub> ) .....  | 78        |
| Receptor Cannabinoide de tipo 2 (CB <sub>2</sub> ).....   | 79        |
| Ligandos endógenos del sistema cannabinoide endógeno..... | 84        |
| Araquidonoiletanolamida o Anandamida.....                 | 84        |
| 2- Araquidonoil Glicerol .....                            | 84        |
| Otros ligandos endógenos .....                            | 85        |
| Metabolismo de los ligandos endógenos .....               | 88        |
| Finalización de la señal biológica .....                  | 89        |
| Farmacología del sistema endocannabinoide.....            | 94        |
| Agonistas.....  | 94        |

|   |            |
|---|------------|
| Antagonistas y agonistas inversos .....   | 96         |
| Modificadores del tono endocannabinoide .....   | 97         |
| Derivados botánicos cannabinoides.....  | 100        |
| <b>El SEC y la modulación de procesos fisiológicos .....</b>  | <b>106</b> |
| <b>El SEC y neuroprotección. Énfasis en las enfermedades Neurodegenerativas.....</b>  | <b>110</b> |
| Cannabinoides frente a la excitotoxicidad .....   | 111        |
| El SEC frente al estrés oxidativo .....   | 111        |
| Papel del SEC en la neuroinflamación .....  | 112        |
| Potencial neuroprotector del SEC como modulador de la autofagia .....   | 113        |
| <b>Cannabinoides y ELA.....</b>   | <b>115</b> |
| Potencial de los Cannabinoides frente a la fisiopatología de la ELA .....   | 116        |
| El SEC en la regulación de la transmisión glutamatérgica.....   | 116        |
| Cannabinoides frente la neuroinflamación .....  | 117        |
| Cannabinoides como estimuladores de la autofagia .....  | 118        |
| Cannabinoides frente al estrés oxidativo .....  | 118        |
| Aplicación de los Cannabinoides frente a la fisiopatología de la ELA.....   | 118        |
| <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>   | <b>123</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>129</b> |
| <b>Diseños Experimentales .....</b>   | <b>131</b> |
| Diseño Experimental 1: Estudio del papel del receptor CB <sub>2</sub> en la fisiopatología de la ELA.....   | 131        |
| Diseño Experimental 2: Búsqueda de nuevas dianas farmacológicas basadas en la administración de derivados fitocannabinoides en un modelo de ELA. .... | 133        |
| Diseño Experimental 3: Validación del potencial terapéutico del fitocannabinoide CBDA. En búsqueda de un tratamiento combinado. ....                  | 136        |
| Diseño Experimental 4: Estudio de la ELA en un modelo experimental de <i>C. elegans</i> . Implicación del SEC. ....                                   | 138        |
| <b>Procedimientos experimentales.....</b>   | <b>141</b> |
| Procedimientos de los Diseños experimentales basados en los modelos murinos.....  | 141        |
| Animales de experimentación.....  | 141        |
| Genotipado .....  | 142        |
| Preparación de compuestos para los tratamientos farmacológicos.....   | 143        |
| Desarrollo del tratamiento farmacológico <i>in vivo</i> .....   | 144        |
| Pruebas comportamentales .....  | 145        |
| Análisis de supervivencia .....   | 146        |
| Sacrificio y obtención de muestras.....   | 146        |
| Técnicas histológicas .....   | 147        |
| Microscopía .....   | 150        |
| Técnicas bioquímicas.....   | 151        |
| Cultivos celulares .....  | 153        |
| Citometría de flujo .....   | 155        |
| Procedimientos del diseño experimental basado en los modelos de nemátodos .....   | 157        |

|  |            |
|--|------------|
| Animales de experimentación .....  | 157        |
| Genotipado y diseño de primers .....   | 158        |
| Pruebas comportamentales .....   | 159        |
| Obtención de muestras .....  | 159        |
| Microscopía .....  | 162        |
| Tratamiento farmacológico .....  | 162        |
| <b>Análisis estadístico.....</b>   | <b>163</b> |
| <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>167</b> |
| <b>Diseño experimental 1: Estudio del papel del receptor CB<sub>2</sub> en la fisiopatología de la ELA.....</b>  | <b>169</b> |
| 1. Activación selectiva del receptor CB <sub>2</sub> mediante el tratamiento de los ratones TDP43 <sup>A315T</sup> con el agonista HU308.....              | 169        |
| 2. Desactivación funcional del receptor CB <sub>2</sub> en los ratones TDP43 <sup>A315T</sup> .....  | 176        |
| 2.1 Bloqueo farmacológico del receptor CB <sub>2</sub> en los ratones TDP43 <sup>A315T</sup> .....   | 176        |
| 2.2 Diseño y caracterización de un modelo experimental doble mutante TDP43 <sup>A315T</sup> ;Cnr2 <sup>-/-</sup> .....                                     | 181        |
| <b>Diseño experimental 2: Búsqueda de nuevas dianas farmacológicas basada en la administración de derivados fitocannabinoides en un modelo de ELA.....</b> | <b>191</b> |
| 1. Evaluación del potencial farmacológico de 6 fitocannabinoides como tratamiento para la ELA .....  | 191        |
| 1.1 Tratamiento farmacológico con fitocannabinoides en los ratones TDP43 <sup>A315T</sup> .....  | 191        |
| 1.2. Evaluación del potencial terapéutico del fitocanabinoide CBDA para el tratamiento de la ELA.....  | 199        |
| 2. Estudios con fitocannabinoides en cultivos celulares .....  | 202        |
| 2.1 Tratamiento en cultivos primarios de astrocitos TDP43 <sup>A315T</sup> .....   | 202        |
| 2.2 Estudios con CBDA mediante medios condicionados de microglía TDP43 <sup>A315T</sup> .....  | 203        |
| 2.3 Identificación de los posibles mecanismos de acción que median el efecto antiinflamatorio del fitocanabinoide CBDA .....                               | 205        |
| <b>Diseño experimental 3. Validación del potencial terapéutico del fitocanabinoide CBDA. En búsqueda de un tratamiento combinado.....</b>                  | <b>209</b> |
| 1. Determinación de la dosis óptima de CBDA y Riluzol en el ratón TDP43 <sup>A315T</sup> , modelo experimental de ELA.....                                 | 209        |
| 2. Evaluación de un posible tratamiento combinado CBDA:Riluzol .....   | 218        |
| <b>Diseño experimental 4: Implicación del SEC en modelos experimentales de ELA en <i>C. elegans</i>.....</b>   | <b>223</b> |
| 1. Caracterización funcional de dos modelos experimentales de ELA en el nemátodo <i>C. elegans</i> .....   | 223        |
| 2. Caracterización molecular del SSEC en los dos modelos de ELA de <i>C.elegans</i> .....  | 228        |
| 3. Estudio del sistema serotoninérgico.....  | 232        |
| 4. Tratamiento farmacológico con AEA.....  | 233        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>   | <b>239</b> |
| <b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>   | <b>265</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>273</b> |
| <b>ANEXO.....</b>  | <b>291</b> |









# **RESUMEN/SUMMARY**

---



## Resumen

Con el aumento de la calidad de vida y el avance de la investigación biomédica, la esperanza de vida en los países industrializados se ha multiplicado en las últimas décadas. Sin embargo, un aumento en la esperanza de vida no implica obligatoriamente la adición de años de vida saludables. En consecuencia, se ha incrementado el impacto de las Enfermedades Neurodegenerativas (END) en estas sociedades cada vez más envejecidas, motivo por el cual las END actualmente son consideradas uno de los principales problemas sanitarios a nivel global. En particular, la Esclerosis Lateral Amiotrófica es una END altamente incapacitante, lo que implica gran impacto socioeconómico y sanitario.

La ELA es una enfermedad que cursa con la degeneración progresiva de las motoneuronas (MNs) que integran el Sistema Nervioso Central (SNC), ya sea en la corteza cerebral (neuronas motoras superiores), como en la médula espinal (neuronas motoras inferiores). Esta neurodegeneración conduce a una pérdida en la comunicación entre la MN y el músculo esquelético, provocando, en consecuencia, debilidad muscular, calambres, espasticidad, atrofia y en último término parálisis muscular. En etapas avanzadas de la enfermedad se produce un fallo en la musculatura bulbar responsable la comunicación oral, deglución y expectoración, y finalmente los pacientes fallecen de fallo respiratorio letal. Esta enfermedad típicamente se inicia a nivel espinal, con la aparición de los primeros signos y síntomas en las extremidades; sin embargo, alrededor del 20% de los casos diagnosticados tienen un inicio a nivel de las MNs superiores corticales, lo que desencadena alteraciones tempranas en el habla, y la capacidad de comer o respirar con normalidad. Este tipo de debut se denomina ELA de inicio bulbar, y presenta peor pronóstico clínico que la ELA de inicio espinal. Actualmente, la esperanza de vida de los pacientes se encuentra entre los 3-5 años. La incidencia de esta enfermedad se encuentra en torno a 1.75 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que su prevalencia oscila entre los 2 y 5 casos por cada 100.000 habitantes. A pesar de su incidencia elevada, debido a su baja tasa de supervivencia, es considerada una enfermedad de baja prevalencia.

La ELA es una enfermedad muy compleja, con una etiología muy diversa, lo que dificulta enormemente encontrar una causa primaria que pueda relacionarse con el inicio de la enfermedad. Se ha identificado en esta enfermedad un potente componente genético muy heterogéneo, que afecta a genes con gran diversidad funcional, lo que desencadena una amplia variedad de disfunciones que dificultan su diagnóstico. Actualmente, se han descrito mutaciones en más de 25 genes relacionadas con la aparición de esta patología, entre los que destacan SOD1, TARDBP, FUS y C9orf72.

A pesar de la heterogeneidad genética que presenta esta enfermedad, se han identificado una serie de mecanismos patogénicos convergentes que son comunes en todos los tipos de ELA, independientemente de la alteración genética que presenten los pacientes, es decir, su aparición no está exclusivamente relacionada con las proteínas codificadas por los diferentes genes de la ELA. Estos eventos fisiopatológicos son la disfunción mitocondrial, con el consiguiente estrés oxidativo, la excitotoxicidad, los procesos neuroinflamatorios, la agregación proteica y los defectos en el procesamiento y estabilidad del ARN, así como alteraciones en el transporte axonal. Además, los pacientes de ELA presentan alteraciones a nivel de la musculatura esquelética. Todos estos eventos actúan de manera cooperativa provocando la neurodegeneración.

A lo largo de los años se han desarrollado numerosos modelos experimentales, generalmente desarrollados en roedores, para investigar las causas primarias a esta enfermedad, así como para evaluar potenciales tratamientos. Estos modelos se basan principalmente en animales modificados genéticamente mediante la inserción de genes humanos que se encuentran mutados en esta patología. Los modelos experimentales, en general, mimetizan gran parte de la sintomatología y las disfunciones orgánicas encontradas en la ELA, por lo que han contribuido enormemente al conocimiento de los eventos fisiopatológicos que se desencadenan en el transcurso de esta enfermedad. Concretamente, en el marco de esta Tesis Doctoral, hemos desarrollado nuestra investigación sobre un modelo murino genético de ELA basado en la mutación A315T de la proteína TDP43, una de las mutaciones más comunes en los pacientes con alteraciones en el gen *tardbp*. Este modelo presenta grandes similitudes fisiopatológicas con los pacientes, y una sintomatología asociada en gran medida equiparable a los síntomas observados en los pacientes de ELA, lo que nos ha resultado de gran utilidad para llevar a cabo nuestra investigación.

A pesar de ser la tercera END en incidencia, la ELA tiene una alarmante falta de tratamientos efectivos. Por este motivo, existe una imperante necesidad de buscar estrategias farmacológicas nuevas y más eficaces para contrarrestar el transcurso de la patología y mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes. Durante los últimos 20 años se han investigado más de 60 terapias frente a los diferentes eventos fisiopatológicos que se desarrollan en esta enfermedad. Sin embargo, no se han conseguido trasladar a clínica los efectos beneficiosos encontrados en los modelos experimentales, y actualmente solo existen dos tratamientos aprobados para hacer frente a la ELA, el Riluzol, tratamiento principal en esta patología, y la Edaravona, recientemente aprobada para su aplicación en Clínica en ciertos países. A pesar de llevar 20 años siendo el fármaco de referencia, el Riluzol muestra efectos neuroprotectores muy moderados, ya que solo es capaz de incrementar la esperanza de vida de los pacientes entre 3-6 meses. Además, este fármaco no está exento de generar efectos secundarios no deseados, como la afectación hepática y las alteraciones gastrointestinales. Debido a que la ELA es una enfermedad multifactorial, en la que participan paralelamente diferentes eventos patogénicos, la estrategia farmacológica más adecuada deberá ser una estrategia multidiana, que incida de manera simultánea en los diferentes eventos que desencadenan la neurodegeneración. En este sentido, creemos que los compuestos cannabinoides podrían ser excelentes candidatos para la búsqueda de nuevos tratamientos frente a esta enfermedad. Por su perfil de amplio espectro, estas moléculas son capaces de activar diferentes dianas que son clave en los eventos patogénicos que se desarrollan en esta enfermedad, como la neuroinflamación, el estrés oxidativo o la excitotoxicidad o la agregación proteica.

El Sistema Cannabinoide Endógeno (SEC) es un sistema de comunicación entre células responsable de la modulación de múltiples procesos fisiológicos. Este sistema se compone de receptores, ligandos específicos (los llamados endocannabinoides) y la maquinaria enzimática responsable de la síntesis y degradación de los endocannabinoides, la cual modula el tono endocannabinoide en el organismo. Las principales enzimas de síntesis de los endocannabinoides son la fosfolipasa D específica de N-acil fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD), responsable principal de la síntesis de la araquidonoiletanolamida, también llamada Anandamida (AEA), y la diacilglicerol lipasa (DAGL), responsable de la síntesis del 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Estas dos moléculas son los principales ligandos del SEC, y a través de la activación de los denominados receptores cannabinoides, median sus efectos fisiológicos. Los principales receptores cannabinoides son proteínas transmembrana de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) heterodiméricas.

Concretamente, los receptores cannabinoides principales, CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, son receptores preferencialmente acoplados a proteínas G<sub>i/o</sub>, por lo que su activación generalmente conduce a una señalización de tipo inhibitoria. Además, los endocannabinoides pueden mediar su efecto por la activación de otros receptores celulares acoplados a proteínas G, diferentes a CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, como es el caso de los receptores GPR55, GPR18 o GPR119, y mediante la activación de canales como los receptores de potencial transitorio (TRPs). Por último, se ha descrito la modulación de los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (receptores PPAR) por parte de diferentes moléculas endógenas de señalización cannabinoide. Por lo tanto, a través de la modulación de estos receptores, los ligandos endocannabinoides son capaces de regular múltiples funciones fisiológicas en el organismo. Los procesos de finalización de señal endocannabinoide se producen por su rápida degradación mediante las enzimas específicas de degradación. La enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) es la responsable principal de la degradación de la AEA, mientras que la monoacilglicerol lipasa (MAGL) se encarga de la degradación del 2-AG. Además, estas enzimas se encargan de la degradación de otras moléculas de señalización que participan en este sistema (*N*-acetiletanolaminas y 2-oilgliceroles)

Mediante la activación del SEC dentro del SNC, los endocannabinoides son capaces de regular múltiples procesos fisiológicos, en parte debido a su localización ubicua en el organismo y en diferentes sustratos celulares. Tanto el receptor CB<sub>1</sub> como el receptor CB<sub>2</sub> participan activamente en el mantenimiento de la homeostasis en el organismo. Sin embargo, debido a su intervención en numerosos procesos fisiológicos, este sistema se encuentra alterado en numerosas patologías. Concretamente, se ha observado una desregulación del SEC en diversas Enfermedades Neurodegenerativas (ENDs), como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington o la ELA. En función de la patología, se han observado alteraciones tanto en la expresión del receptor CB<sub>1</sub> como CB<sub>2</sub>. Concretamente en la ELA, se ha descrito una sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub> desde etapas tempranas de la sintomatología, y que se mantiene durante toda la progresión de la enfermedad. Se ha sugerido que esta desregulación responde a un posible mecanismo neuroprotector endógeno que es activado tras el daño neuronal progresivo que se está produciendo en esta patología. En este sentido, el uso de terapias farmacológicas basadas en la modulación del SEC, tanto mediante el uso de fitocannabinoides como de cannabinoides sintéticos, han demostrado tener resultados positivos en diferentes modelos experimentales basados en mutaciones de SOD1. Además, los cannabinoides sintéticos, por su perfil de activación definido, son excelentes herramientas experimentales para estudiar la implicación del SEC en el transcurso de esta patología.

Por lo tanto, la principal **HIPÓTESIS** de trabajo de esta Tesis Doctoral es que, las alteraciones que se producen en el SEC durante el transcurso de la ELA responden a un mecanismo neuroprotector endógeno. Por lo tanto, el desarrollo de terapias farmacológicas que incidan en el SEC, potenciando sus efectos, surtirán un efecto beneficioso global frente a los procesos neurodegenerativos que transcurren en esta patología.

Para validar esta hipótesis general, nos planteamos abordar los siguientes **objetivos específicos**:

1. Puesto que la sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub> descrita en la ELA responde a un mecanismo neuroprotector endógeno, se propone evaluar el efecto de la activación farmacológica del receptor CB<sub>2</sub> durante la progresión de la enfermedad en los animales, con el fin de averiguar si será capaz de prevenir la muerte neuronal y retrasar el inicio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en el modelo de ELA de TDP43<sup>A315T</sup>. Por otro lado,



investigaremos las consecuencias de eliminar el receptor CB<sub>2</sub> durante el transcurso de la patología, tanto mediante el bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> como su eliminación genética.

2. Investigar el potencial terapéutico de 6 fitocannabinoides con diferentes perfiles de amplio espectro de actuación sobre el SEC y otros sistemas de neurotransmisión en el modelo de ELA de TDP43<sup>A315T</sup>, con el fin de evaluar si estos tratamientos experimentales mejorarán o retrasarán los procesos neurodegenerativos, al producir un efecto neuroprotector basado en la modulación del SEC, ejerciendo efectos beneficiosos sobre los eventos fisiopatológicos que se desencadenan en esta enfermedad.
3. Con el fin de determinar el beneficio potencial de una posible terapia combinada con fitocannabinoides, llevaremos a cabo un tratamiento experimental en combinación con el fármaco de referencia en esta enfermedad, el Riluzol.
4. Dado que el SEC está altamente conservado en la filogenia, trataremos de validar la utilización de nuevos modelos experimentales para el estudio de la participación del SEC en características fisiopatológicas concretas que ocurren en la ELA. Por lo tanto, confirmaremos que es posible utilizar los modelos experimentales desarrollados en nemátodo *C. elegans* como una herramienta válida para estudiar el papel del SEC sobre ciertos eventos fisiopatológicos que transcurren en la ELA.

Durante el desarrollo del Diseño Experimental 1, con el objetivo de identificar el papel de la sobreactivación del receptor CB<sub>2</sub> en la ELA, se desarrolló un tratamiento farmacológico con un potente agonista selectivo del receptor, el compuesto HU308. Tras este experimento comprobamos que potenciar la activación de este receptor en los animales redujo el impacto de ciertos eventos fisiopatológicos que se desarrollan en esta enfermedad. Por un lado, a nivel funcional, la activación farmacológica del receptor ejerció un efecto positivo al retrasar la distonía y espasticidad en los animales, aunque, por otro lado, este tratamiento no consiguió retrasar o prevenir la disfunción motora observada en estos animales. Además, los estudios histológicos realizados tras el sacrificio de los animales con el tratamiento mostraron un incremento en la supervivencia de las MNs en estadios avanzados de la patología, acompañada de un descenso en la inmunorreactividad de las células de microglía. Asimismo, estas células de microglía mostraron cambios morfológicos marcados, con un descenso en el tamaño del soma celular y un incremento de la longitud de las ramificaciones, morfología clásicamente relacionada con un fenotipo de tipo protector o M2.

En la segunda parte de este diseño experimental, quisimos evaluar el efecto del bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> en la progresión de esta enfermedad. En efecto, el bloqueo del receptor CB<sub>2</sub> desde etapas tempranamente sintomáticas produjo un adelanto en la aparición del fenotipo motor, así como en la aparición de los signos de distonía y espasticidad en estos animales. Por otro lado, en etapas de sintomatología avanzada, estos animales no mostraron una disfunción mayor que los animales del modelo experimental tratados con vehículo. Asimismo, tampoco encontramos una mayor pérdida de MNs en la médula espinal de estos ratones, ni un incremento en los procesos de activación glial, medida tanto en astrocitos como en microglía. Por lo tanto, el bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> produjo un adelanto del debut de la enfermedad en los sujetos experimentales, sin embargo, no agravó los signos y síntomas de la neurodegeneración. Para tratar de evaluar de forma más precisa la implicación de este receptor a lo largo de la patología, en un experimento adicional generamos ratones dobles mutantes con la delección del receptor CB<sub>2</sub> en los animales que presentaban la inserción de la proteína humana mutada TDP43<sup>A315T</sup>. De este modo, pudimos evaluar cómo se desarrolla esta patología en

el modelo experimental de ELA sin la presencia endógena del receptor. A nivel funcional, los animales dobles mutantes mostraron disfunción motora en etapas presintomáticas del modelo experimental de ELA, en torno a 4 semanas antes de aparecer los síntomas motores en los animales TDP43<sup>A315T</sup>. Además, comprobamos que la carencia del receptor CB<sub>2</sub> en los ratones transgénicos para TDP43 afectaba directamente a la supervivencia de estos animales. En relación con esta disfunción motora temprana, los animales dobles mutantes mostraron un descenso significativo en el número de MNs en la médula espinal a los 60 días de edad, acompañado de un incremento de la activación de las células de glía, eventos que no observamos en los animales transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> por ser etapas presintomáticas del modelo. Sin embargo, una vez alcanzadas etapas avanzadas de la enfermedad, ambos modelos presentaron niveles similares de astrogliosis y microgliosis acompañando a una pérdida neuronal en grados similares.

Por lo tanto, gracias a estas tres aproximaciones experimentales, pudimos confirmar que, en efecto, la activación del receptor CB<sub>2</sub> ejerce un beneficio frente a la neurodegeneración asociada a la ELA, y, por otra parte, pudimos establecer un patrón temporal en el que el receptor CB<sub>2</sub> es especialmente necesario produciendo sus efectos neuroprotectores, en etapas presintomáticas y tempranamente sintomáticas.

En el Diseño Experimental 2, se llevó a cabo un estudio farmacológico en los animales TDP43<sup>A315T</sup> con una serie de derivados fitocannabinoides de perfil multidiana con el propósito de evaluar el potencial terapéutico de cada compuesto. Estos compuestos actúan sobre otras dianas farmacológicas adicionales al receptor CB<sub>2</sub> estudiando en el Diseño Experimental 1, como los receptores PPAR $\gamma$ , CB<sub>1</sub>, GPR55, etc. En todos los casos, se llevó a cabo un seguimiento de la ganancia o pérdida de peso, acompañado de pruebas comportamentales para evaluar tanto la funcionalidad motora como la aparición de signos patológicos como la distonía y la espasticidad. Concretamente, evaluamos el potencial terapéutico de los fitocannabinoides de perfil de actuación clásico  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCV y (*E*)-BCP, con capacidad de activar los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, y los fitocannabinoides de perfil atípico CBD, CBDA y CBDV, que no muestran una acción directa sobre los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, pero sí sobre otras dianas del SEC. Adicionalmente, en todos los casos aprovechamos las características antioxidantes que tienen estos compuestos.

Tanto  $\Delta^9$ -THCV como (*E*)-BCP tuvieron un efecto positivo retrasando el inicio de la disfunción motora, pero, a pesar de su perfil de activación del receptor CB<sub>2</sub>, ninguno de los tres fitocannabinoides clásicos fue capaz de prevenir o retrasar la muerte de las MNs espinales de los animales. Sin embargo, tanto el  $\Delta^9$ -THCV como el  $\Delta^9$ -THC modularon los procesos neuroinflamatorios que se desarrollan en el contexto de esta patología. Por otro lado, todos los fitocannabinoides de perfil atípico fueron capaces de preservar las MNs espinales en los animales, aunque sólo en el caso del CBDA, esta neuroprotección vino acompañada de mejoras a nivel funcional en los animales. Por otro lado, tanto CBD, CBDA como CBDV mostraron un efecto antiinflamatorio mediante la reducción de la activación de las células de microglía. Adicionalmente, evaluamos la capacidad de los fitocannabinoides de modular la activación de la microglía mediante el análisis de diferentes características morfológicas. Tanto el fitocannabinoides de perfil clásico  $\Delta^9$ -THCV como los fitocannabinoides atípicos CBDA y CBDV fueron capaces de alterar la morfología de la microglía, llevándola hacia estados ramificados, asociados con procesos de inactivación/ activación alternativa (fenotipo M2). Además, tras los tratamientos con CBDA y CBDV observamos una reducción en los niveles de expresión génica de citoquinas proinflamatorias.

Para intentar identificar el posible efecto de estos tratamientos en la gliosis observada en el modelo experimental de ELA, llevamos a cabo una serie de ensayos *in vitro* en cultivos primarios de astrocitos y microglía con los dos fitocannabinoides de mejor perfil de cada categoría. De esta manera comprobamos primero, que el fitocannabinoide  $\Delta^9$ -THCV ejerce un beneficio reduciendo los niveles de activación astrocitaria. Por otro lado, el fitocannabinoide CBDA, ejerce un papel modulador de las células de microglía, que a su vez modifican el perfil de activación de los astrocitos. Este resultado parece indicar que ambas estrategias de modulación celular, tanto a nivel de los astrocitos como en las células de microglía, dan como resultado la reducción general de la gliosis *in vivo*. El efecto del CBDA sobre la microglía fue confirmado posteriormente con estudios de Citometría de flujo llevados a cabo en muestras de médula espinal procedente de los animales.

Una vez identificado el potencial antiinflamatorio del CBDA, en el Diseño Experimental 3 seleccionamos este fitocannabinoide como uno de los compuestos con mayor interés de desarrollo hacia la Clínica. Por ello, quisimos identificar si la administración conjunta con CBDA y el tratamiento actual en la ELA, el Riluzol, podría mejorar los leves efectos neuroprotectores que ha mostrado este fármaco antiexcitotóxico en la Clínica. Para ello, inicialmente se llevaron a cabo una prueba de dosis tanto de CBDA como de Riluzol para determinar la dosis óptima de ambos para la coadministración. A pesar de que en ninguna de las dosis de Riluzol fue capaz de prevenir la disfuncionalidad motora ni la pérdida neuronal, seleccionamos la dosis de 10 mg/kg por los efectos producidos atenuando la activación microglial. Los resultados de la administración conjunta de ambos compuestos mostraron que la terapia combinada no ejerció ningún efecto sumatorio a los efectos observados tras la administración de CBDA en exclusividad.

En conjunto, los resultados derivados de los tratamientos farmacológicos del Diseño Experimental 2 y 3 han demostrado que el fitocannabinoide CBDA presenta el perfil neuroprotector más potente de todos los compuestos evaluados en el modelo experimental de TDP43<sup>A315T</sup>, destacando por su perfil antiinflamatorio. Por todo ello, este compuesto presenta un alto potencial para el desarrollo hacia la Clínica. Además, tras los resultados obtenidos en los tratamientos con los diferentes fitocannabinoides queda demostrada la importancia de la modulación del SEC en la reprogramación del fenotipo microglial hacia uno reparador en la fisiopatología de la ELA.

En último lugar, realizamos el Diseño Experimental 4, llevado a cabo durante una estancia breve predoctoral en la Universidad de Washington como parte del cumplimiento de la Mención Internacional de esta Tesis Doctoral. Para este diseño experimental, nos propusimos investigar el sistema de señalización de tipo endocannabinoide en un modelo de invertebrados de ELA. Se trata de dos modelos de nemátodo *C. elegans* basados en la inserción en el genoma de estos animales de dos mutaciones de la proteína TDP43 (M337V y A315T). Ambos modelos experimentales mostraron una desregulación de los diferentes elementos del SSEC en las etapas sintomáticas del modelo. Por otro lado, llevamos a cabo una caracterización de marcadores funcionales de la fibra muscular, observando de nuevo una desregulación en los estadios sintomáticos de la enfermedad en estos animales. Por último, desarrollamos un tratamiento farmacológico con diferentes dosis del endocannabinoide AEA en estos animales, observando una mejoría funcional en el caso de los animales TDP43<sup>A315T</sup>. Por lo tanto, estos resultados nos confirman que el SEC está ampliamente conservado en la filogenia, y de nuevo se encuentra desregulado debido en esta patología.

En resumen, las conclusiones de esta Tesis Doctoral son:

1. La sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub> en el modelo de ELA basado en la proteína TDP43<sup>A315T</sup> responde a un mecanismo endógeno protector, y su activación farmacológica desde periodos tempranamente sintomáticos es capaz de ejercer un efecto neuroprotector, ya que preserva las MNs y es capaz de reducir la activación de las células de microglía en la médula espinal de los animales.
2. Tanto el bloqueo farmacológico como la delección del receptor CB<sub>2</sub> aceleran la aparición de la sintomatología motora de los animales, así como de la aparición de gliosis y la degeneración neuronal. Sin embargo, no incrementa la severidad de la fisiopatología una vez alcanzadas las etapas avanzadas de la enfermedad.
3. Los fitocannabinoides  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCV, CBDA y CBDV presentan propiedades terapéuticas que los hacen potencialmente beneficiosos frente a ciertos eventos fisiopatológicos que se desarrollan en la ELA, especialmente frente a la neuroinflamación.
4. El fitocannabinoides CBDA reduce la disfuncionalidad motora en los animales TDP43<sup>A315T</sup>, además de prevenir la muerte neuronal, los procesos de oxidación celular y la sobreactivación glial.
5. El CBDA ha mostrado además excelentes propiedades antiinflamatorias al ser capaz de reducir la microgliosis y favorecer un cambio en el fenotipo de activación de estas células hacia uno reparador (M2), promoviendo así un ambiente antiinflamatorio protector. Además, el cambio en el perfil de activación de las células de microglía tras la administración de CBDA es capaz de producir un cambio en el perfil de activación de los astrocitos.
6. El bloqueo simultáneo de los receptores CB<sub>2</sub> y PPAR $\gamma$  no revierte las propiedades antiinflamatorias del fitocannabinoides CBDA, por lo que este compuesto parece actuar sobre otros receptores de función similar.
7. Al igual que ocurre en los pacientes, el tratamiento farmacológico con el agente anti-glutamatérgico Riluzol mostró efectos beneficiosos leves y variables en el modelo experimental de TDP43<sup>A315T</sup>.
8. La coadministración de CBDA y Riluzol no mejoró los efectos beneficiosos del tratamiento con CBDA de forma individual. Esta ausencia de efecto sumatorio, probablemente se deba al efecto opuesto que ambos compuestos ejercen sobre la microglía, factor clave en la fisiopatología de esta enfermedad en el modelo experimental murino con el que trabajamos.
9. El SEC se encuentra alterado en dos modelos de ELA desarrollados en *C. elegans*, y su modulación mediante la aplicación de ligandos exógenos mejora el fenotipo locomotor de estos animales.
10. La mutación de TDP43<sup>A315T</sup> provoca defectos funcionales, pero no estructurales, en el músculo esquelético de los animales, tanto en ratones como en nemátodos. Parece que las alteraciones en la conexión músculo-neurona preceden a la atrofia muscular.

## Summary

Owing to the increase in life quality and the advances in biomedical research, life expectancy in industrialized countries has multiplied in recent decades. However, extending life expectancy does not necessarily imply the addition of healthy life years. As a result, there is an increase in Neurodegenerative Diseases (ND) due to increasingly aging societies. For this reason, ND are now considered one of the main health problems worldwide. Specifically, Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a highly disabling ND, which implies a great socioeconomic and health impact.

ALS is a progressive and disabling disease characterized by the progressive loss of upper cortical and lower spinal motor neurons (MN) in the Central Nervous System. Due to neurodegeneration, there is muscle denervation leading to weakness, cramps, spasticity, atrophy, and, finally paralysis. In advanced stages of the disease, a failure in the bulbar muscles responsible for oral communication, swallowing, and/or expectoration occurs, and patients die because of a lethal respiratory failure. This disease typically begins at the spinal level, with the appearance of the first signs and symptoms in the limbs; however, about 20% of the diagnosed cases have an onset at the upper cortical motor neurons, triggering early alterations in speech, and the ability to eat or breathe normally. This type of ALS is called bulbar-onset and has a worse clinical prognosis than spinal-onset. Currently, the life expectancy of patients is between 2-5 years. The incidence of this disease is around 1.75 cases per 100,000 inhabitants, although due to its low survival rate, it is considered a low prevalence disease.

ALS is a diverse etiology disease, making it extremely difficult to find a primary cause linked to the onset of the symptoms. A highly heterogeneous genetic component has been identified in ALS, affecting genes with great functional diversity, which triggers a wide variety of dysfunctions. This issue makes the diagnosis of this pathology quite difficult. Currently, it has been described mutations in more than 25 genes related to the appearance of this pathology, among which SOD1, TARDBP, FUS, and C9orf72 stand out. Despite the heterogeneity, converging pathogenic mechanisms have been identified in this pathology common to all types of ALS. These pathophysiological events are mitochondrial dysfunction with oxidative stress, excitotoxicity, neuroinflammatory processes, protein aggregation, and defects in RNA processing and stability, as well as alterations in axonal transport. Besides, ALS patients present alterations at the level of skeletal muscle. All these events act in a cooperative manner causing neurodegeneration.

Over the years, numerous experimental models have been generated to find a primary cause for this disease, as well as to evaluate potential treatments. These models are mainly, but not only, murine genetically modified models carrying human mutated genes. These experimental models mimic not only the symptomatology but also dysfunctions found in ALS, and therefore, have contributed to the understanding of the pathophysiological events that occur during this disease. Specifically, on this Doctoral Thesis, we have researched with a transgenic murine model of ALS based on the A315T mutation of the TDP43 protein, one of the most frequent mutations that appear in patients with alterations in the *tardbp* gene. This model shows physiopathological similarities with patients and present associated symptoms that are comparable to those observed in ALS patients, which has been very useful for our research.

Despite being the third most common ND, ALS exhibit a shocking lack of effective treatments. For this reason, there is an urgent need to seek new and more effective pharmacological strategies to counteract the course of the disease and significantly improve the quality of life of patients. During the last 20 years, more than 60 therapies have been postulated to counteract the different physiopathological events that occur in ALS. However, it has not been possible to transfer the beneficial effects found in experimental models to the clinic, and currently there are only two treatments approved for ALS, Riluzole, the reference drug for this pathology, and Edaravone, recently approved for Clinical application. Despite being the reference drug for 20 years, Riluzole shows moderate neuroprotective effects, as it is only able to increase the life expectancy of patients by 3-6 months. Moreover, this drug is not exempt from generating undesirable side effects, such as liver involvement and gastrointestinal disorders. Since ALS is a multifactorial disorder, in which different pathogenic events are involved in parallel, the most appropriate pharmacological strategy should be a multi-target strategy, affecting the different events that trigger neurodegeneration. In this way, we believe that cannabinoid compounds could be excellent candidates for the search for new treatments against this disease. Due to their broad-spectrum profile, these molecules can activate different targets that are key in the pathogenic events that develop in this disease, such as neuroinflammation, oxidative stress, excitotoxicity or protein aggregation.

The Endocannabinoid System (ECS) is a regulatory signaling system responsible for the modulation of multiple physiological processes. This system has receptors, specific ligands, the so-called endocannabinoids, and enzymatic machinery responsible for the synthesis and degradation of endocannabinoids, which modulates the endocannabinoid tone in the body. The main enzymes for the synthesis of endocannabinoids are N-acyl phosphatidylethanolamine specific phospholipase D (NAPE-PLD), which is primarily responsible for the synthesis of arachidonylethanolamide, also called Anandamide (AEA), and diacylglycerol lipase (DAGL), which is responsible for the synthesis of 2-arachidonoiglycerol (2-AG). These two molecules are the main ligands of ECS, and through activation of the cannabinoid receptors, they mediate its physiological effects. Cannabinoid receptors are two transmembrane proteins of the superfamily of receptors coupled to heterodimeric G-proteins (GPCRs). In particular, the main cannabinoid receptors, CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>, are receptors preferentially coupled to inhibitory G/ O proteins, and their activation leads to inhibitory signaling. In addition, endocannabinoids can mediate their effect by activating other G-protein-coupled cellular receptors, other than CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>, such as GPR55, GPR18, or GPR119, and by activating channels such as transient potential channels (TRPs). Finally, the modulation of nuclear receptors activated by peroxisome proliferators (PPAR receptors) by different endogenous cannabinoid signaling molecules has been described. Therefore, through the modulation of these receptors, the endocannabinoid ligands can regulate multiple physiological functions. Endocannabinoid signal ending processes are produced by their rapid degradation, carried out by specific degradation enzymes. The fatty acid amide hydrolase (FAAH) is the main enzyme responsible for the degradation of AEA, while monoacylglycerol lipase (MAGL) is responsible for the degradation of 2-AG.

By activating the ECS within the CNS, endocannabinoids can regulate multiple physiological processes. Due to its ubiquitous location in the body and different cellular substrates, ECS has an important regulatory role. Both the CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors are actively involved in the maintenance of homeostasis. However, also due to its involvement in numerous physiological processes, this system appears altered in many pathologies. Deregulation of the ECS has been observed in various ND, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, and ALS. Depending on the pathology, alterations

have been observed in both the expression of the CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. Specifically, in ALS, overexpression of the CB<sub>2</sub> receptor has been described from early stages and is maintained throughout the progression of the disease. It has been suggested that this upregulation responds to an endogenous neuroprotective mechanism activated after the progressive neuronal damage. Because of that, the use of pharmacological therapies based on ECS modulation, both using phytocannabinoids and synthetic cannabinoids, has shown positive results in different experimental models of mSOD1. Furthermore, synthetic cannabinoids, due to their defined activation profile, are excellent experimental tools to study the involvement of ECS during this pathology.

Therefore, the principal working **HYPOTHESIS** of this Doctoral Thesis is: During ALS, there is a physiological modulation of the ECS that is in response to an endogenous neuroprotective mechanism. Therefore, the development of pharmacological therapies that affect this defense mechanism, maintaining it, or enhancing the activation of the ECS, will have a positive effect on the neurodegenerative processes that occur in this pathology.

In this context, during the development of this Doctoral Thesis, an attempt has been made to explain the involvement of the CB<sub>2</sub> receptor during the progression of this pathology in an experimental murine model of ALS based on the TDP43<sup>A315T</sup> mutation. Furthermore, we have tried to validate the possible neuroprotective effect of a series of phytocannabinoids that are capable of directly or indirectly modulating various signaling pathways related to ECS. To confirm this general hypothesis, the following **specific aims** have been postulated:

- Since the overexpression of the CB<sub>2</sub> receptor described in ALS responds to an endogenous defense mechanism, it is proposed to assess the effects of pharmacological activation of this receptor in the experimental model based on the TDP43<sup>A315T</sup>, to identify whether this will be able to prevent neuronal death and delay the onset of the pathophysiological events of the disease. On the other hand, we will investigate the CB<sub>2</sub> receptor elimination during the course of the pathology, both by pharmacological blocking and its genetic ablation.
- To investigate the therapeutic potential of 6 multi-target Phytocannabinoids in the ALS model of TDP43<sup>A315T</sup> to assess whether these experimental treatments will improve or delay neurodegenerative processes by producing a neuroprotective effect based on ECS modulation, and therefore exerting beneficial effects on the physiopathological events triggered in this disease.
- In order to determine the potential benefit of phytocannabinoids combination therapy, we will carry out an experimental treatment in combination with the reference drug in this disease, Riluzole.
- Given that ECS is highly conserved in phylogeny, we will try to validate the application of new experimental models to study the involvement of ECS in specific pathophysiological events occurring in ALS. Therefore, we will confirm that it is possible to use the experimental models developed in *C. elegans* nematode as a valuable and accurate tool to study the role of ECS on certain pathophysiological events occurring in ALS.

During the development of this work, interest has focused on certain physiopathological events that are predominant in ALS, such as the death of MNs and the glial activation processes that go with it.

In Experimental Design 1, to identify the role of CB<sub>2</sub> receptor over-activation in ALS, mice were treated with a potent selective receptor agonist, compound HU308. Following this experiment, we found that enhancing the activation of this



receptor in animals improved certain pathophysiological events that occur in this disease. On the one hand, at a functional level, pharmacological receptor activation had positive effects by delaying dystonia and spasticity in the animals. Besides, histological studies conducted after sacrifice showed an increase in the survival of treated MNs in advanced stages of the disease, accompanied by a decrease in the immunoreactivity of microglia cells. Besides, these microglial cells showed a marked morphological change, showing a reduction in the size of the soma cell and an increase in the length of the branches, shape classically related to a protective type activation phenotype, or M2. However, this treatment did not manage to delay or prevent the motor dysfunction observed in these animals.

In the second part of this design, we evaluate the effect of the pharmacological blockade of the CB<sub>2</sub> receptor on the progression of this disease. CB<sub>2</sub> receptor Blockade from early symptomatic stages accelerated the onset of locomotion symptoms, as well as in the appearance of the signs of dystonia and spasticity in these animals. On the other hand, in stages of advanced symptomatology, these animals did not show a greater dysfunction than the animals of the experimental model treated with vehicle. Likewise, we did not find a greater loss of MNs in the spinal cord of these mice compared with animals treated with vehicle, nor an increase in glial activation processes, measured both in astrocytes and in microglia. Therefore, the pharmacological blockade of the CB<sub>2</sub> receptor produced an early onset of the disease in the experimental subjects, however, it did not aggravate the signs and symptoms of neurodegeneration. To try to evaluate the involvement of this receptor throughout the pathology, we additionally generated an experimental model of double mutants based on the deletion of the CB<sub>2</sub> receptor in the TDP43<sup>A315T</sup> animals. In this way, we were able to evaluate how this pathology develops in the experimental ALS model without endogenous receptor activation. The first thing we observed was that, at a functional level, the double mutant animals showed motor dysfunction in pre-symptomatic stages of the experimental model of ALS, around 4 weeks before the motor symptoms appeared in the TDP43<sup>A315T</sup> animals. In addition, we found that the lack of the CB<sub>2</sub> receptor in the experimental model of ALS directly affected the life expectancy of these animals, with a decrease in survival average of about 50 days. Concerning this early motor dysfunction, the double mutant animals showed a significant decrease in the number of MNs in the spinal cord at 60 days of age, accompanied by an increase in the activation of glial cells, events that we did not observe in the animals of the experimental model of ALS because they were pre-symptomatic stages of the model. However, once mice reached 90 days of age, both models showed similar levels of astrogliosis and microgliosis, accompanied by neuronal loss in similar ranges.

Therefore, with these three experimental approaches, we were able to confirm that activation of the CB<sub>2</sub> receptor does indeed benefit the neurodegeneration associated with ALS, and therefore, it is proposed as a pharmacological target. On the other hand, we were able to establish a time pattern in which the CB<sub>2</sub> receptor is especially needed producing its neuroprotective effects, in pre-symptomatic and early symptomatic stages.

In Experimental Design 2, a pharmacological experiment was carried out in TDP43<sup>A315T</sup> transgenic mice with several phytocannabinoids derivatives to evaluate their therapeutic potential. These compounds have other pharmacological targets in addition to the CB<sub>2</sub> receptor studied in Experimental Design 1, such as the receptors PPAR $\gamma$ , CB<sub>1</sub>, GPR55, etc. In all cases, weight gain was monitored, and behavioral tests were made to evaluate both motor functionality and the appearance of pathological signs such as dystonia and spasticity. We assessed the therapeutic potential of  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCV, and (E)-BCP, which can activate the CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors, and the phytocannabinoids CBD, CBDA, and CBDV, with

an atypical profile, without direct action on CB2 or CB1 receptors, but the ability to activate other ECS targets. In all cases, we take advantage of the antioxidant properties of these compounds. In all cases, we take advantage of the antioxidant properties of these compounds. Both  $\Delta^9$ -THCV and (E)-BCP had a positive effect by delaying the onset of motor dysfunction, but despite their CB<sub>2</sub> receptor activation profile, none of the three classical phytocannabinoids were able to prevent or delay the death of the spinal MNs. However, both  $\Delta^9$ -THCV and  $\Delta^9$ -THC modulated the neuroinflammatory processes that take place in the context of this pathology. On the other hand, all no-classical profile phytocannabinoids were able to preserve spinal MNs in animals, although only in CBDA improved the functionality in animals. On the other hand, both CBD, CBDA, and CBDV showed an anti-inflammatory effect reducing the activation of microglia cells, CBDA and CBDV the astrogliosis processes, an effect that we did not observe after the treatment with the phytocannabinoid CBD. Additionally, we evaluated the capacity of phytocannabinoids to modulate the activation of the microglia by means of morphological analyses. Both the classic profile phytocannabinoid  $\Delta^9$ -THCV and the atypical phytocannabinoids CBDA and CBDV were able to modulate the morphology of the microglia towards branched states, associated with alternative inactivation/activation processes (M2 phenotype). Moreover, after the treatments with CBDA and CBDV, we observed a reduction in the levels of gene expression of proinflammatory cytokines.

To identify the possible effect of these treatments on the gliosis observed in the experimental model of ALS, we carried out a series of *in vitro* tests on primary cultures of astrocytes and microglia with the two phytocannabinoids with the best profile in each category. In this way, we first proved that the phytocannabinoid  $\Delta^9$ -THCV exerts a benefit by reducing the levels of astrocyte activation. On the other hand, the phytocannabinoid CBDA plays a modulating role in the microglial cells, which in turn modify the activation profile of astrocytes. This seems to indicate the existence of two different activation strategies that result in the reduction of gliosis *in vivo*. The effect of CBDA on microglia was subsequently confirmed by flow cytometry studies carried out on spinal cord samples from the animals.

Once the anti-inflammatory potential of CBDA had been identified, in [Experimental Design 3](#), we chose this compound due to the great interest it arouses for the development of clinical applications. We investigated whether co-administration with the reference drug for the treatment of ALS, Riluzole, could improve its neuroprotective effects. To this end, a dose test of both CBDA and Riluzole was initially performed to determine the optimal dose for co-administration. Although none of the doses of the anti-glutamatergic agent Riluzole were able to prevent motor dysfunction or neuronal loss, we selected the dose of 10 mg/kg for the effects produced by attenuating microglial activation. The results of the combined administration of CBDA showed that the combined therapy did not exert any effect in addition to the effects observed after the administration of CBDA exclusively.

Overall, the results derived from the pharmacological treatments of Experimental Design 2 and 3 have shown that the phytocannabinoid CBDA has the most powerful neuroprotective profile of all the compounds evaluated in the experimental model of TDP43<sup>A315T</sup>, standing out for its anti-inflammatory profile. Therefore, this compound has a high potential for development towards the Clinic. Furthermore, the results obtained in the treatments with the different phytocannabinoids demonstrate the importance of SEC modulation in the reprogramming of the microglial phenotype towards a repairing one in the physiopathology of ALS.

Finally, as part of the fulfillment of the International Mention for this Doctoral Thesis, we carried out Experimental Design 4 during a brief pre-doctoral stay at the University of Washington. For this experimental design, we set out to investigate the endocannabinoid-type signaling system (ECSS) in two ALS invertebrate model. These are two models of the *C. elegans* nematode based on the insertion of two mutations of the human TDP43 protein (M337V and A315T). Both experimental models showed a deregulation of the different elements of the endocannabinoid-type signaling system in the symptomatic stages of the model. On the other hand, we carried out a characterization of functional markers of the muscle fiber, observing again a deregulation in the symptomatic stages of the disease in these animals. Finally, we developed a pharmacological treatment with different doses of the endocannabinoid AEA in these animals, observing a functional improvement in the case of the TDP43<sup>A315T</sup> animals. Therefore, these results confirm that ECS is widely conserved in phylogeny, and again it is deregulated due to this pathology.

In summary, the conclusions of this Doctoral Thesis are:

1. Since there is an endogenous neuroprotective upregulation of the CB<sub>2</sub> receptor in the ALS TDP43<sup>A315T</sup> mice, the pharmacological activation of CB<sub>2</sub> from early symptomatic periods can enhance the endogenous neuroprotective response since it preserves the MNs and can reduce the activation of microglial cells in the spinal cord of the animals.
2. Both pharmacological blocking and CB<sub>2</sub> receptor deletion accelerates the onset of motor symptoms in the ALS TDP43 mice, as well as arise of gliosis and neurodegeneration. However, this functional block does not increase pathological severity at the advanced stages of the disease.
3. The therapeutic properties of Phytocannabinoids Δ<sup>9</sup>-THC, Δ<sup>9</sup>-THCV, CBDA y CBDV make these compounds potentially beneficial against certain pathophysiological events that occur in ALS, specially neuroinflammation.
4. Phytocannabinoid CBDA reduces motor dysfunction in TDP43<sup>A315T</sup> animals and prevents neuronal death, protein oxidation, and glial overactivation.
5. CBDA has shown an excellent anti-inflammatory profile as it can decrease microgliosis and change the phenotype of activation of these cells towards a repairing one (M2), thus promoting a protective anti-inflammatory environment. CBDA promotes changes in the microglial cells' activation profile and, consequently, this boosts an adjustment in the astrocyte's activation profile.
6. Blocking together the CB<sub>2</sub> and PPAR<sub>γ</sub> receptors does not reverse the anti-inflammatory properties of the phytocannabinoid CBDA, so this compound seems to exert the activation of other receptors with similar functions.
7. As in patients, drug treatment with the anti-glutamatergic agent Riluzole showed mild and variable beneficial effects in the experimental model of TDP43<sup>A315T</sup>.
8. Co-administration of CBDA and Riluzole did not improve the beneficial effects of CBDA treatment alone. This lack of additive effects is probably due to an antagonistic effect that both compounds have on the microglia, a crucial factor in the physiopathology of the disease in the TDP43<sup>A315T</sup> mice model.
9. The Endocannabinoid-like System is disrupted in two *C. elegans* ALS models, and its modulation through the application of exogenous ligands improves the locomotion in these animals.
10. The TDP43<sup>A315T</sup> mutation causes functional but not structural defects in the skeletal muscle of the animals, both in mice and nematodes. It seems that alterations in the muscle-neuron connection precede muscle atrophy.







# INTRODUCCIÓN

---





# Esclerosis Lateral Amiotrófica

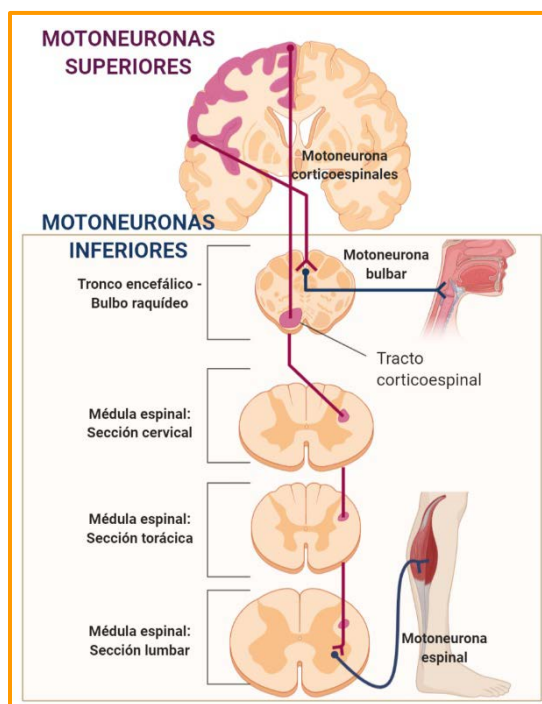
## Aspectos generales

Dentro de las enfermedades que cursan con degeneración progresiva y/o muerte de grupos determinados de neuronas en diferentes áreas del Sistema Nervioso Central (SNC), las denominadas enfermedades neurodegenerativas (END), encontramos las enfermedades de la motoneurona (EMN). Este grupo de patologías se caracteriza por la degeneración progresiva de las motoneuronas (MNs), que son las neuronas encargadas de generar y regular los impulsos motores. En las EMN, la muerte de las MNs provoca principalmente la pérdida de la función muscular voluntaria. **La Esclerosis lateral Amiotrófica (ELA)**, también conocida como la enfermedad de Lou Gehrig en Estados Unidos, es la EMN más común en el individuo adulto, comprendiendo entre el 80-90% de los casos. Tanto es así, que en algunos casos se utiliza el término general “enfermedad de la motoneurona” para hacer referencia a esta patología<sup>1-3</sup>. En general, la ELA es un trastorno muy heterogéneo con edades de aparición muy variadas, aunque la edad media de aparición es de 55-60 años y con mayor incidencia en hombres, en una proporción de aproximadamente 1,3/1<sup>4</sup>.

La ELA fue descrita por primera vez por el neuropatólogo Jean-Martin Charcot, en 1869, que fue quien le dio el nombre que conocemos actualmente. El término Esclerosis Lateral Amiotrófica hace referencia a las características patológicas de la enfermedad: **Esclerosis lateral**, por la aparición de una cicatriz glial que provoca un ‘endurecimiento’ en la zona lateral de la medula espinal; y **amiotrófica**, por la atrofia muscular consecuente tras la pérdida de innervación que se produce debido a la degeneración progresiva de la MN.

A diferencia de la mayoría de las EMN, en las que solo se ven afectadas las MNs inferiores, la ELA se caracteriza por la pérdida progresiva de las MNs tanto superiores como inferiores. Debido a ello, se ven afectadas diversas estructuras dentro del sistema nervioso, desde tractos corticoespinales y corticobulbares al tronco encefálico y cuerpos celulares del asta ventral de la medula espinal (**Figura 1**). Como consecuencia de esta degeneración progresiva,

aparecen tanto disfunción a nivel bulbar, debido a la atrofia de la musculatura facial y del cuello, como denervación de la musculatura esquelética de los miembros inferiores y posteriores, lo que produce



**Figura 1. Esquema simplificado del Sistema Motor.** Este sistema se compone de las MNs superiores (corticoespinales) y MNs inferiores (bulbares y espinales), que inervan el músculo esquelético. *Adaptado de Brown et al. 2017*

cuello, etc., lo que convierte a los pacientes en personas altamente dependientes. La debilidad en la musculatura torácica responsable de los movimientos respiratorios provoca en última instancia la muerte<sup>5</sup>.

La vasta mayoría de los pacientes diagnosticados con ELA tienen un pronóstico notablemente severo. Actualmente, la media de supervivencia de los pacientes, desde la aparición de los síntomas hasta la aplicación de soporte ventilatorio forzado o defunción, se encuentra entre los 24 y los 50 meses <sup>2,6</sup>. Por otro lado, alrededor del 10% de los pacientes presentan un desarrollo lento de la patología, pudiendo alcanzar los 10 años de supervivencia.

El conjunto de las END representa, junto con las afecciones cardiovasculares y el cáncer, una de las principales causas de muerte en la sociedad actual. Dentro de las END, la ELA ostenta la tercera posición por su incidencia, por detrás de la Enfermedad de Parkinson y las demencias tipo Alzheimer. En el mundo, se estima que hay aproximadamente 1.75 casos por cada 100.000 mil habitantes, lo que nos permite catalogarla dentro de las conocidas como enfermedades raras.<sup>3,7,8</sup>. Debido a su alta letalidad, es considerada una enfermedad de baja prevalencia, ya que es un parámetro que depende directamente de la supervivencia, oscilando en Europa entre 1.1-8.2 casos cada los 100.000 habitantes<sup>9</sup>.

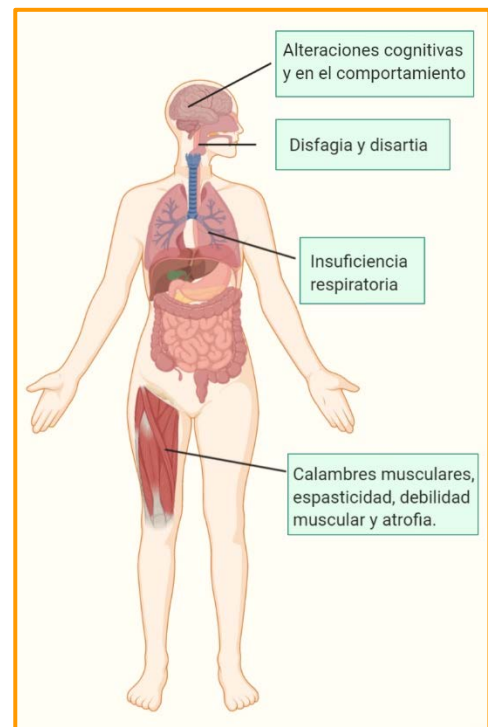
Concretamente, en España se estima que se diagnostican 3 casos nuevos de ELA al día, y actualmente en nuestro país hay diagnosticadas alrededor de 4.000 personas con esta patología. Además, en el año 2014 se estimó un gasto sanitario asociado de 44.500 euros al año por paciente, datos similares a lo que ocurre en el entorno internacional. De esta forma, en términos de gasto sanitario y asistencial, la ELA implica un coste similar por paciente a los gastos asociados a las enfermedades de Alzheimer y Parkinson en conjunto (48.000 euros por paciente al año). Si lo analizamos desde el punto de vista general, en costes totales de gasto médico, la ELA implica costes millonarios anuales a la sanidad española, de los que destacan los gastos directos no médicos, los derivados de recursos como servicios sociales y otros cuidados informales (**Figura 2**)<sup>10</sup>. Estas estimaciones en asignación de recursos sanitarios, tanto directos como asociados, ponen de manifiesto la enorme carga económica y social que pueden llegar a representar las END, y más concretamente la ELA por ser altamente incapacitante. Por este motivo, además de los esfuerzos de la investigación para el desarrollo de tratamientos capaces de retrasar, frenar o curar esta enfermedad, todos los esfuerzos terapéuticos están puestos en mejorar la calidad de vida de los pacientes.

| CUIDADOS SINTOMÁTICOS EN LA ELA  |  |
|--|--|
| <b>Debilidad y discapacidad</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ortopedia.</li> <li>• Fisioterapia.</li> <li>• Accesibilidad (andador, silla de ruedas).</li> </ul>   | <b>Labilidad emocional</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación a los pacientes y cuidadores.</li> <li>• Amitriptilina.</li> <li>• Benzodiazepinas.</li> <li>• Dextrometorfano</li> </ul>  |
| <b>Disfagia</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluación por un logopeda.</li> <li>• Adaptación de la dieta.</li> <li>• Intubación.</li> </ul>  | <b>Depresión y ansiedad</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Asesoramiento psicológico.</li> <li>• Benzodiazepinas.</li> <li>• Antidepresivos.</li> </ul>  |
| <b>Disnea y tos deficiente</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Soporte ventilatorio.</li> <li>• Morfina y Benzodiazepinas.</li> <li>• Fisioterapia torácica.</li> <li>• Máquina succionadora.</li> <li>• Técnicas manuales para inducir la tos.</li> </ul>  | <b>Trastorno del sueño</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tratamiento del problema subyacente.</li> <li>• Revisión respiratoria, ventilación no invasiva.</li> <li>• Benzodiazepinas, antidepresivos tricíclicos.</li> </ul>   |
| <b>Dolor (Calambres, fasciculaciones y espasticidad, escaras posturales)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fisioterapia, AINES.</li> <li>• Relajantes musculares (baclofeno, toxina botulínica).</li> <li>• Anticonvulsivantes (Gabapentina).</li> <li>• Reposicionamiento postural.</li> <li>• Tratamiento con opioides.</li> <li>• Cojines y colchones especiales para aliviar la presión.</li> </ul> | <b>Estreñimiento</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambios en la dieta.</li> <li>• Fibra.</li> <li>• Laxantes orales.</li> </ul>  |
| <b>Disartria</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluación por logopeda.</li> <li>• Ayudas para la comunicación.</li> <li>• Formación de los cuidadores.</li> </ul>  | <b>Saliva Espesa</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidratación.</li> <li>• Nebulizadores.</li> <li>• Succión.</li> </ul>  |
|  | <b>Sialorrea</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Antidepresivos anticolinérgicos (Amitriptilina).</li> <li>• Anticolinérgicos.</li> <li>• Inyecciones de bótox.</li> <li>• Radiación de las glándulas salivares.</li> <li>• Productos bucales.</li> <li>• Succión.</li> </ul> |

**Figura 2. Cuidados de los pacientes con ELA. Adaptado de Kiernan et al. 2011**

## Tipos de ELA: Sistemas de clasificación

Existen diferentes sistemas de clasificación de esta patología. Por un lado, si atendemos a la forma de inicio de la enfermedad a nivel anatómico, podemos clasificarla en **ELA de inicio espinal**, en el que prevalecen las alteraciones en la segunda MN o **MN inferior**, produciendo inicialmente defectos en la innervación de la musculatura esquelética de las extremidades, y, por lo tanto, los síntomas asociados son la debilidad muscular y la parálisis<sup>1</sup>. La afectación de las extremidades superiores o inferiores puede darse de manera simétrica o asimétrica, incluyendo uno o los dos miembros (ambos brazos, ambas piernas, o solo uno de ellos)<sup>1,11,12</sup>. Generalmente la disfunción en las extremidades no viene acompañada de dolor. La ELA de inicio espinal es el tipo de ELA más común y de mejor pronóstico<sup>1</sup>. Por otro lado, hablamos de **ELA de inicio bulbar** cuando las alteraciones iniciales incluyen los núcleos de los nervios craneales, a nivel cortical, y por tanto afectan a la **MN superior**. En este caso se produce una disfunción temprana a nivel de la musculatura **bulbar**. Debido a la alteración de las funciones esenciales llevadas a cabo por estos músculos, estos defectos cursan con alteraciones en el habla y la capacidad de tragar, comer y respirar, y una disfunción en acciones tan esenciales como la expectoración, lo que desencadena una mayor incidencia de infecciones respiratorias en estos pacientes. Este tipo de ELA responde a un pronóstico mucho peor, y se presenta en un tercio de los casos diagnosticados<sup>11</sup>. A pesar de esta clasificación, el marcador clínico clásico de las enfermedades de la EMN, independientemente de su inicio, es la disfunción de las MNs inferiores, que desencadena en una atrofia y debilidad muscular, y que provoca calambres musculares y fasciculaciones de las unidades motoras afectadas<sup>1</sup>. En la **Figura 3** se muestran los principales síntomas de esta enfermedad.



**Figura 3. Sintomatología clínica de la ELA.** La sintomatología motora es la principal manifestación clínica de esta enfermedad, pero además los pacientes pueden presentar otra batería de síntomas no motores. *Adaptado de Hardiman et al. 2017.*

A pesar de que existen estas clasificaciones, la sintomatología en los pacientes es muy diversa, y en ocasiones la ELA debuta de manera simultánea tanto en las funciones bulbares como en las extremidades<sup>11</sup>. Cuando esto ocurre, y aparece una afectación inicial mixta de la primera y segunda MN, generalmente implican el desarrollo de una progresión más rápida y de peor pronóstico<sup>13</sup>.

Atendiendo a la clínica, la ELA puede ser diagnosticada en base a los criterios diagnósticos establecidos por la Federación Mundial de Neurología en 1994, en su guía de El Escorial (Más información en el **Cuadro 1**). A lo largo de los años, estos criterios han sufrido modificaciones y actualizaciones hasta los criterios actuales de clasificación, utilizados tanto para fines de investigación básica como para la inclusión de los pacientes en ensayos clínicos<sup>14,15</sup>.

Por último, existe un método de clasificación de esta enfermedad atendiendo a la historia clínica familiar de los pacientes, de forma que se puede diferenciar entre formas de ELA familiar (ELAf) o esporádica (ELAe). Clásicamente se ha catalogado a la ELA como una enfermedad predominantemente esporádica, pero en ocasiones se ha conseguido establecer una relación de herencia familiar e identificar un patrón de herencia mendeliano. Generalmente estos patrones de herencia descritos son dominante con penetrancia completa y dominante con penetrancia incompleta, pero también se han identificado casos de ELAf de

herencia recesiva, y casos de herencia ligada al cromosoma X<sup>16,17</sup>. Se define un caso de ELA como ELAf si existe presencia de la enfermedad en parientes de primer y segundo grado. De lo contrario, se cataloga como variante esporádica. En torno al 95% de los pacientes con ELA no tienen familiares de primer grado afectados con la patología, y por tanto se considera que este grupo de pacientes presenta la variante esporádica.<sup>18</sup> Sin embargo, algunos autores argumentan que muchos de los casos de ELA diagnosticados como esporádicos pueden tener un historial familiar por detrás que se desconoce. Además, en ocasiones ciertos casos de ELAf con baja penetrancia se catalogan erróneamente como ELAe.

Por otro lado, el componente genético de ambas variedades es innegable, y si bien la predominancia de unas mutaciones respecto a otras varía de entre la ELAf y la ELAe, ambas variedades presentan alteraciones genéticas similares en los mismos genes diana, como por ejemplo los genes *sod1*, *fus*, *tardbp*, etc., lo que las hace indistinguibles en cuanto a fisiopatología y su sintomatología asociada. Se han identificado mutaciones causantes de la enfermedad en genes que responden a un patrón de herencia mendeliana en el 75% de los casos de ELAf y en el 14% de los casos de pacientes sin

**Cuadro 1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS PARA LA ELA DE EL ESCORIAL Y AIRLIE HOUSE. Adaptado de Hardiman 2017.**

**Presencia de:**

- (a) Evidencia de degeneración de MNs inferiores mediante examen clínico, electrofisiológico o neuropatológico;
- (b) Evidencia de degeneración de MNs superiores por examen clínico; y
- (c) Progresión del síndrome motor en una región o hacia otras regiones, determinado por el historial clínico o mediante examen; y

**Ausencia de:**

- (a) Evidencia electrofisiológica o patológica de otros procesos de enfermedad que pudieran explicar los signos de neurodegeneración de la MN inferior o superior; y,
- (b) Evidencia por neuroimagen de otro proceso de enfermedad que pudiera explicar la clínica observada y los signos electrofisiológicos

**Categorías de Certeza Diagnóstica (Criterios de El Escorial)**

*Definido como ELA:* Signos en MNs superiores e inferiores en tres regiones.  
*Probable ELA:* Signos en neuronas motoras superiores e inferiores en al menos dos regiones, con signos rostrales a (por encima) signos de MNs inferiores.

*Possible ELA:* Signos en MNs inferiores y superiores en una región; signos en MN superior en dos o más regiones, o signos en MN inferior sobre MN superior.

*Sospecha ELA\*:* Signos en las MNs inferiores en dos o más regiones

**Categorías de Certeza Diagnóstica (Criterios de Airlie House)**

*Clínicamente definido como ELA:* Evidencia clínica de síntomas en MNs inferiores y superiores en tres regiones.

*Clínicamente probable ELA:* evidencia clínica de signos en neuronas motoras superiores e inferiores en al menos dos regiones con algunos signos de neuronas motoras superiores rostrales a los signos de neuronas motoras inferiores.

*Clínicamente probable ELA-apoyado por pruebas de laboratorio:* Síntomas clínicos de disfunción de la MN superior e inferior en una sola región, o signos en la MN superior sola en una región con signos en la MN inferior obtenidos por electromiografía en al menos dos miembros, junto con evidencias de neuroimagen y ausencia de otras causas comprobada mediante protocolos de laboratorios clínicos.

*Possible ELA:* Signos clínicos de disfunción en la MN inferior y superior en una única región, o en la MN superior en dos o más regiones; o en la MN inferior sobre la MN superior, siempre que el diagnóstico de la categoría anterior no pueda ser aprobado.

\*Esta categoría se ha eliminado de los criterios de El Escorial revisados.

historial de ELA en la familia, catalogados como ELAe. Por lo tanto, esta clasificación tiende a ser más relevante en Clínica, y se utiliza para establecer un patrón de incidencia y debut de la enfermedad dentro de la misma familia, pero biológicamente no tiene especial trascendencia<sup>16,19</sup>.

## Etiología

La etiología de la ELA es muy diversa, por lo que no existe una causa directa clara que pueda relacionarse con el inicio de la enfermedad. No obstante, existen diversos estudios que apuntan a diferentes causas, entre las que podemos encontrar tanto factores ambientales como genéticos.

Por una parte, algunos estudios epidemiológicos han tratado de asociar la aparición de la enfermedad con diversos factores ambientales. Podemos destacar los estudios que se llevaron a cabo en una región concreta del Pacífico, la isla de Guam en Japón, donde se observó una mayor incidencia de ELA en comparación con otras regiones del mundo. Con este propósito, se trató de trazar una relación entre los hábitos alimentarios de sus habitantes y la aparición de la enfermedad, hipotetizando sobre la posible causa ambiental. Sin embargo, todavía no ha sido posible establecer una relación causal directa entre una exposición ambiental y la enfermedad. Por otro lado, se ha tratado de identificar diversidad de factores de riesgo asociados a la ELA, como ejercicio intenso (deporte profesionales), tabaquismo, sobreexposición a metales pesado, pesticidas, cianotoxinas, factores desconocidos en ciertos clústeres geográficos, etc., pero por el momento no se ha podido establecer ninguna asociación directa<sup>20,21</sup>. Los intentos por hallar una relación causa-efecto entre factores de riesgo ambientales y una enfermedad tan diversa como la ELA representan un gran desafío<sup>21,22</sup>. Primero, por la dificultad que supone tratar de relacionar la exposición a un agente ambiental, puntual o repetida, a uno o varios factores ambientales, con su posible contribución a desarrollar esta patología. Además, porque el contexto en el que se da esa exposición es tan importante como la propia exposición. En este sentido, cabría plantearse que ciertas exposiciones ambientales puedan tener relevancia en un contexto genético concreto (personas con una variante genética susceptible o de riesgo genético para padecer esta enfermedad)<sup>13</sup>.

La identificación de una causa genética directa en las END es un paso muy importante a la hora de identificar su patrón de incidencia en la población. Sin embargo, esto no es siempre una tarea sencilla. En el caso de la ELA, se suman otros factores que hacen esta tarea aún más compleja, como la heterogeneidad genética que presenta, con alteraciones en genes de muy diferente funcionalidad, lo que produce una gran variabilidad de síntomas que se relacionan con esta patología. Todo esto ha provocado que la investigación en este sentido haya sido muy posterior a la identificación de la ELA como una enfermedad con entidad propia. Los avances en la Biología Molecular en los años 80-90 permitieron, no solo aseverar el componente genético presente en la ELA, previamente descrito por William Osler en 1880, sino finalmente establecer una relación causal entre mutaciones en el gen de la Superóxido dismutasa 1 (SOD1) y la enfermedad<sup>23</sup>. El descubrimiento de las mutaciones en el gen *sod1* en la enfermedad, en 1993, supuso el inicio de un largo recorrido de identificación de diversos genes implicados en esta patología, aunque, durante muchos años este fue el único gen cuyas mutaciones se asociaron a la ELA. Sin embargo, los avances en la investigación genética, especialmente a partir del siglo XXI, han contribuido enormemente a nuestro conocimiento sobre la ELA, y en los últimos años este escenario genético ha sufrido

una transformación sustancial (**Figura 4**). A día de hoy han sido identificados una larga lista de genes implicados, en mayor o menor medida, con el desarrollo de esta patología. Actualmente sabemos que variantes en al menos 25 genes conocidos representan hasta el 70% de los casos de ELAf, y que otro conjunto de genes ha sido identificado como genes susceptibles de estar afectados en esta patología<sup>13,24</sup>. A pesar de esta gran variedad de genes implicados en el desarrollo de la ELA, cuatro de ellos destacan por su mayor relevancia, ya que son responsables de al menos el 60% de los casos de ELA familiar, y alrededor de un 11 % de ELA esporádica. Estos son los genes que codifican para las proteínas SOD1, TDP43, FUS y C9orf72.

### Mutaciones en el gen SOD1

Tras el descubrimiento de la implicación de SOD1 en la

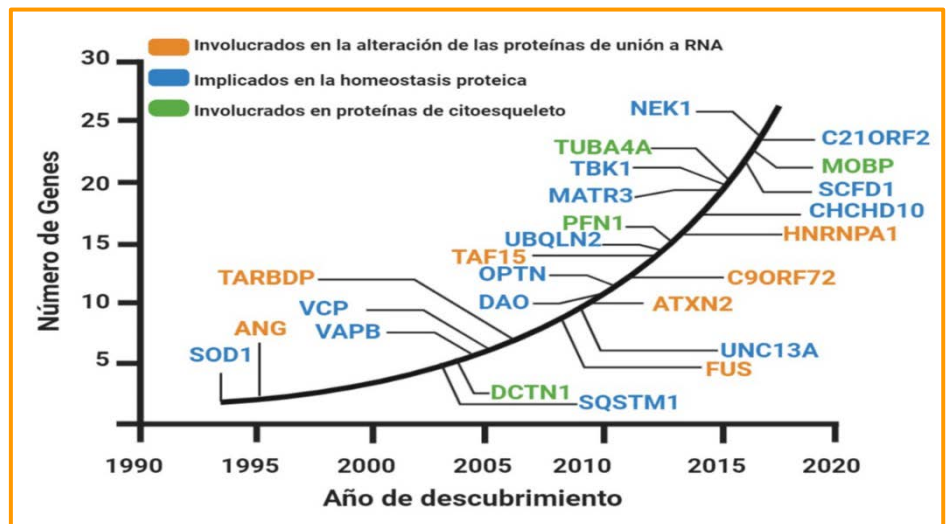
patogenia de la ELA por primera vez en 1993, se han identificado más de 160 mutaciones en este gen asociadas directamente con la aparición de la enfermedad. La mutación G93A, posiblemente la más frecuente, fue la primera en descubrirse, y dio lugar al primer modelo experimental de ELA.

SOD1 es una enzima catalítica localizada tanto en el citoplasma celular como en mitocondrias, y es capaz de transformar los radicales superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Esta función es esencial en la protección celular frente al estrés oxidativo (EO). Además, trabajos recientes han relacionado el papel de esta enzima en procesos metabólicos, en la regulación de la transcripción y en el mantenimiento del balance redox<sup>25</sup>.

Lejos de lo que pudiéramos esperar, no es la pérdida o variación en la funcionalidad fisiológica de SOD1, resultante de las mutaciones, lo que provoca la patología, sino que las alteraciones en el gen conducen a la formación de agregados intracelulares de esta proteína, y debido a ello, adquieren características citotóxicas, lo que se conoce como ganancia de función tóxica<sup>19,26</sup>. Estas inclusiones intracelulares formadas por agregados de la proteína SOD1, llamadas “inclusiones hialinas de tipo cuerpos de Lewy” son las mayoritarias, pero no exclusivas, en los casos de ELA debido a la mutación de SOD1<sup>27</sup>, y aparecen en las mitocondrias de neuronas y astrocitos, provocando defectos morfológicos y funcionales en estos orgánulos. La pérdida de integridad de las mitocondrias provoca la acumulación de calcio y con ello alteraciones en la homeostasis del mismo, lo que hace a las células más sensibles a la excitotoxicidad mediada por glutamato<sup>26,28</sup>.

### Mutaciones en el gen TARDBP

Desde el año 2008 se han identificado más de 40 mutaciones en el gen TARDBP (Proteína de unión a ADN de tipo transactivo, por sus siglas en inglés), y se ha establecido que entre el 4 y el 6% de los casos de ELAf que no presentan mutaciones en SOD1, presentan mutaciones en TARDBP. Además, estas mutaciones aparecen en entre el 0-2% de los casos



**Figura 4. Evolución del descubrimiento de genes relacionados con la ELA desde 1990.** Adaptado de Brown et al 2017.



diagnosticados como ELAe<sup>16,19</sup>. Sin embargo, a pesar de la importancia de las mutaciones de TARDBP en esta patología, no es indispensable una alteración en el gen para que se produzcan los agregados de la proteína 43 de unión al ADN TAR (TDP43, por sus siglas en inglés)<sup>29</sup>. En 2006 se identificó la proteína TDP43 como el componente mayoritario en inclusiones citoplasmáticas en casos de ELA y Demencia Frontotemporal (DFT). De hecho, el 97% de casos de ELA presentan agregados proteicos de TDP43, sin ser necesariamente casos que presenten mutaciones en TARDBP<sup>30</sup>.

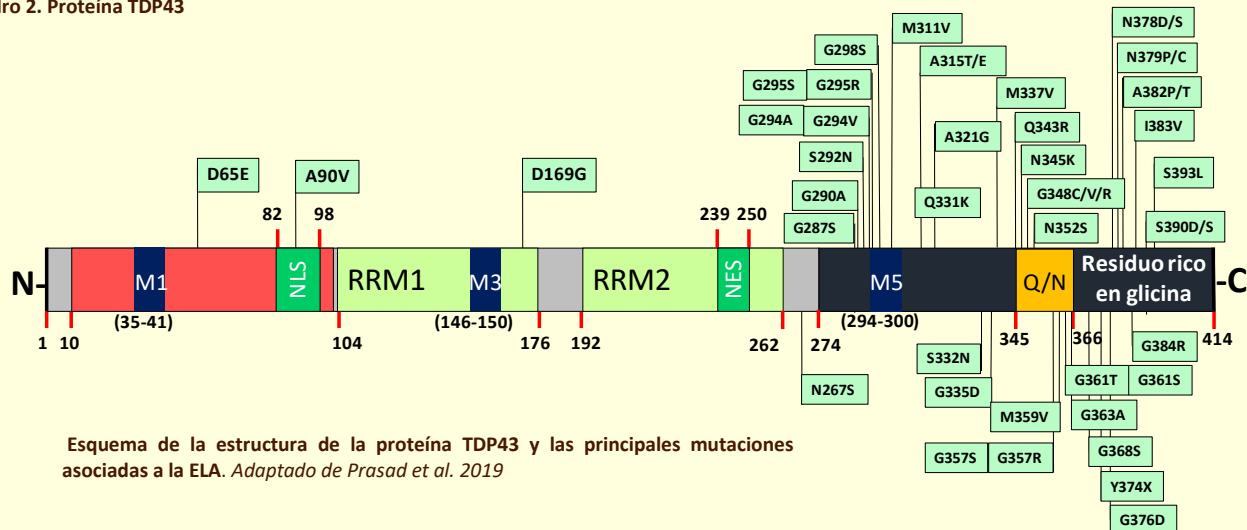
La proteína TDP43 es una proteína nuclear de interacción con el ARN que juega un papel crucial en el metabolismo de este. Hasta la fecha, se han descubierto numerosas funciones nucleares y citoplasmáticas en las que participa esta proteína, como el procesamiento y empalme del pre-ARN, el procesamiento y la regulación de microARNs, entre otros<sup>30,31</sup>. Además, controla el transporte y la estabilidad del ARNm a través de su reclutamiento e inclusión en los conocidos como gránulos de estrés (SG, por sus siglas en inglés)<sup>30</sup>. En condiciones fisiológicas, la proteína TDP43 se localiza mayoritariamente en el núcleo de las MNs, aunque bajo ciertas condiciones puntuales se puede translocar al citoplasma. Sin embargo, en las TDP43 proteinopatías, se produce una deslocalización citoplasmática anómala de esta proteína. Además, se han descrito una serie de alteraciones en la homeostasis de esta proteína, entre las que se incluye su depleción, con la consiguiente formación de fragmentos tóxicos, que favorecen la agregación proteica en el citoplasma<sup>32,33</sup>. Los agregados proteicos e inclusiones citoplasmáticas han sido identificadas como marcador patológico de muchas END, incluida la ELA. Estos agregados patológicos presentan una acción dual. Por un lado se produce un defecto de funcionalidad o pérdida de función y por otro adquieren una ganancia de función tóxica<sup>34</sup>. Concretamente, muchas de las proteínas que forman estas inclusiones o agregados en la ELA son codificadas por genes que aparecen mutados en esta enfermedad<sup>33</sup>.

En el caso de TDP43, se ha podido determinar la región C-terminal de la proteína como el lugar susceptible de modificaciones debidas a mutaciones en el gen, concretamente el exón 6 del gen TARDBP, que codifica para la región rica en glicina de este dominio<sup>16,19,30,33</sup> (**Cuadro 2**). Así, mutaciones en el C-terminal incrementan la propensión intrínseca a agregar que presenta esta región. Otras mutaciones en el dominio C-terminal del gen están relacionadas con un aumento de acumulación de la proteína en los SG, o incrementan la susceptibilidad de la proteína a la acción aberrante de ciertas proteasas. Por otro lado, mutaciones en los dominios de señalización nuclear y de exportación alteran el equilibrio núcleo-citoplasma de esta proteína<sup>33,35</sup>.

Generalmente, los agregados proteicos vienen acompañados de modificaciones postraduccionales de la proteína. Las dos modificaciones postraduccionales más significativas en esta patología son la ubiquitinación y la fosforilación, aunque existen otras como la acetilación, poli-ADP ribosilación o la oxidación de cisteínas. La proteína TDP43 tiene 41 serinas, 15 treoninas y 8 tirosinas susceptibles de fosforilación, proceso en el que participan tanto las caseína quinasas 1 y 2 (CK1 y CK2), como la proteína quinasa relacionada con el ciclo celular, CDC-7. Ambas quinasas median la fosforilación de varias serinas, incluidas la ser409/ser410, consideradas clave en esta enfermedad. Por otro lado, es una característica común en la ELA la aparición de depósitos ubiquitinados, siendo la parkina, una ligasa de ubiquitina, una de las proteínas responsables de este proceso<sup>33</sup>.

A día de hoy, se desconoce la causa primaria de la muerte de las MNs en la ELA asociada a mutaciones en TDP-43, si es la disfunción en la proteína lo que provoca la degeneración celular, por mutaciones de pérdida de función, o si es debido a la acumulación tóxica de agregados citoplasmáticos de la proteína (ganancia de función tóxica). En realidad, puede que ambos eventos participen de forma conjunta en la pérdida de las MNs. En cualquier caso, se ha estipulado que la acumulación de TDP43 en el citoplasma puede ser consecuencia secundaria de otros eventos patogénicos primarios<sup>32</sup>.

## Cuadro 2. Proteína TDP43



TPD43 es una proteína de 417 aminoácidos (aa) codificada por el gen TARDBP, situado en el cromosoma 1. Esta proteína presenta un dominio N terminal (1-102 aa), con señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés). A continuación, contiene dos RRM y una señal de exportación nuclear (NES, por sus siglas en inglés). Por último, presenta un dominio C terminal (274-414 aa), compuesto de una región de tipo priónica rica en residuos de glutamina/asparagina (región Q/N) y una región rica en glicina.

Esta proteína se localiza principalmente en el núcleo celular, pero bajo ciertas circunstancias es transportada al citoplasma. En condiciones patológicas, como ocurre en la ELA, existe un incremento de esta proteína en el citoplasma, dando lugar a la formación de inclusiones. Por otro lado, esta proteína se puede localizar también en el interior de la mitocondria, lo que viene determinado por sus tres motivos internos M1, M3 y M5<sup>33</sup>.

Diferentes estudios sugieren que la proteína TDP43 requiere de la formación de homodímeros para llevar a cabo ciertas funciones fisiológicas, como el *splicing* de ARN. La formación de homodímeros confiere mayor solubilidad a esta proteína<sup>33</sup>. Asimismo, se ha relacionado su capacidad de formar dímeros con su potencial de agregación. La unión de las proteínas para formar el dímero se produce en la región N terminal, de manera *head to head*, siendo los primeros 10 residuos de cada proteína esenciales para la dimerización. Estos primeros residuos se han visto implicados también en la agregación patológica de la proteína<sup>652</sup>. Además, el dominio N terminal promueve la auto-oligomerización de TDP43, de manera concentración dependiente, lo que altera o condiciona su capacidad de unirse a ácidos nucleicos<sup>653</sup>. Esto es especialmente relevante ya que la auto oligomerización incrementa la propensión de la región C terminal a agregar<sup>33,654</sup>. Recientemente se ha descubierto una región en N terminal que, por distanciamiento espacial, dificulta la agregación en C terminal. De hecho, mutaciones en la región NLS de N terminal inducen la relocalización de TDP43 a citoplasma y la formación de agregados<sup>33</sup>.

La región C terminal tiene especial relevancia en el comportamiento patogénico de TDP43 en la ELA por diferentes motivos. Primero, al igual que otros dominios de tipo priónico, es intrínsecamente desordenada, lo que la hace altamente propensa a la agregación. Además, en esta región de la proteína se concentran la mayoría de las mutaciones relacionadas con la ELA asociada a TDP43, además de contener los sitios de fosforilación. Por último, debido a la acción aberrante de caspasas, se producen ciertos fragmentos derivados de esta región que son altamente citotóxicos, y que predominan en las inclusiones citoplasmáticas que aparecen en pacientes con ELA<sup>33</sup>.



## Mutaciones en el gen FUS

Como consecuencia del descubrimiento de las mutaciones en el gen *tardbp*, posteriormente se puso el foco en genes que codificaban para proteínas similares. En 2009 se descubrió el papel de la proteína de unión a ARN *Fused in Sarcoma* (FUS), en formas tempranas de ELA<sup>26,36</sup>. Esta proteína presenta similitudes con TDP43, tanto a nivel estructural como a nivel funcional, ya que también está implicada en la regulación transcripcional y procesamiento de ácido ribonucleico (ARN). De igual modo que ocurre con TDP43, FUS se localiza en el núcleo y es transportado al citoplasma en condiciones de estrés celular, donde se une a ARNm y forma los llamados SG. Una vez finalizada la situación de estrés, estas estructuras desaparecen. Sin embargo, en condiciones patológicas, los SG permanecen, forman agregados y contribuyen a los eventos citotóxicos que están aconteciendo<sup>32</sup>. Las mutaciones en la proteína FUS se concentran en torno a la región C- terminal, de nuevo en un residuo rico en glicina<sup>19,29</sup>. Se han encontrado alrededor de 50 mutaciones en FUS en casos de ELA y aparece en un 5% de estos. Las mutaciones en *fus* están asociadas a alguno de los casos más severos y de peor pronóstico de ELA, los de inicio temprano<sup>29,32</sup>. Además, aunque FUS aparece mutado mayoritariamente en casos de ELA, también se han encontrado mutaciones en casos mixtos de ELA/DFT e incluso en casos exclusivos de DFT<sup>16,19</sup>.

### Cuadro 3. ELA Y DFT, LOS DOS EXTREMOS DE UN ESPECTRO

La DFT es la segunda demencia presenil de mayor incidencia. Está caracterizada por la atrofia y pérdida progresiva de los lóbulos frontal y temporal. Esta enfermedad está asociada a diferentes END, como la parálisis supranuclear progresiva o el síndrome corticobasal, e incluso llega a solapar clínicamente con la ELA<sup>655</sup>.

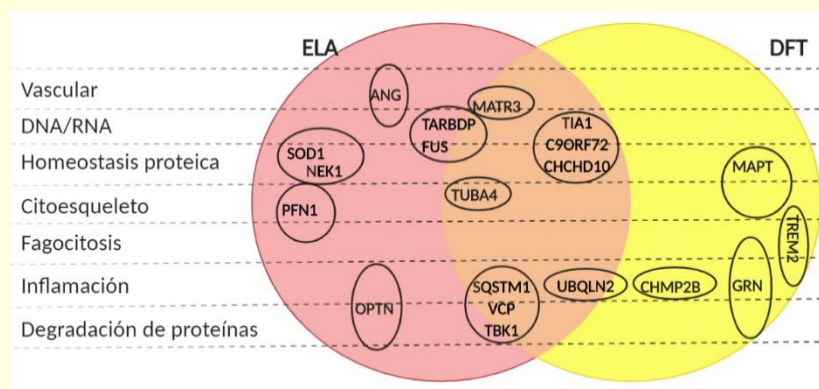
A lo largo de los años ha ido desechándose la idea de que la ELA y la Demencia Frontotemporal (DFT) son dos enfermedades independientes, para pasar a considerarlas como dos extremos de un "síndrome en espectro ELA-DFT". Este cambio de concepción ha sido gracias a crecientes evidencias de que ambas enfermedades presentan alteraciones genéticas y patológicas comunes. Por ejemplo, el 97% de los pacientes con ELA y en torno al 50% de DFT presentan depósitos de la proteína TDP43 en sus inclusiones citoplasmáticas<sup>656</sup>.

Ambas enfermedades comparten características fisiopatológicas como defectos en la autofagia, daños en los mecanismos de reparación del ARN, alteración en el transporte núcleo-citoplasma, alteración en las dinámicas de formación de los SG y alteraciones en el procesamiento y estabilidad del ARN.

Por otro lado, estudiando los genes asociados con de ambas enfermedades se puede observar que existe un importante grado de solapamiento genético entre la DFT y la ELA. Ambas enfermedades presentan de manera recurrente mutaciones en diversos genes, siendo las mutaciones en FUS, TARDBP y C9orf72 mayoritarias<sup>657</sup>.

Mutaciones en FUS y TDP43 están involucrados en el metabolismo aberrante del ARN, y esta es una característica fisiopatológica común en ambas enfermedades. Además, el descubrimiento de las mutaciones en el gen C9orf72, causa mayoritaria de ambas enfermedades, afianzó la concepción del espectro ELA-DFT<sup>655</sup>.

Inicialmente se definía a la ELA como una enfermedad que cursaba con debilidad y atrofia muscular y degeneración de las MNs superiores e inferiores, sin síntomas conductuales y cognitivos. Sin embargo, posteriormente se observó que ciertos pacientes mostraban un déficit cognitivo en etapas tempranas de la enfermedad, que eventualmente terminaban desarrollando DFT. Esto permitió relacionar ambas patologías también a nivel clínico. Aproximadamente el 15% de los pacientes con DFT desarrollan sintomatología motora característica de la ELA, mientras que el 50% de los pacientes con ELA presenta características fisiopatológicas relacionadas con la DFT. Esto pacientes con etiología mixta tienen una esperanza de vida significativamente más reducida comparados con los que presentan sintomatología de una sola de estas enfermedades<sup>657</sup>.



Principales genes involucrados en ELA, DFT y el espectro ELA-DFT. Adaptado de Gao et al. 2017 y Redford et al. 2015

## Mutaciones en el gen C9ORF72

La mutación en el gen c9Orf72 fue descubierta en 2011. Se trata de una expansión por repetición de un hexanucleótido (GGGGCC) en una secuencia no codificante del gen C9orf72. En condiciones normales, el gen C9orf72 presentan menos de 23 repeticiones de este hexanucleótido, aunque el 90% de las personas no llegan a tener más de 10 repeticiones. Sin embargo, en condiciones patológicas, este número asciende a más de 5000 repeticiones<sup>36</sup>. No obstante, no parece existir una relación directa entre el número de repeticiones con la severidad de la enfermedad en el caso de la ELA<sup>32,37,38</sup>. El papel de esta mutación es especialmente relevante, ya que se ha descrito un amplio porcentaje de pacientes de ELA que presentan expansiones en este gen. De hecho, aparece como la principal mutación, y aunque su incidencia varía geográficamente, aparece en entre un 35- 40% de en los casos de ELA<sup>32,36</sup>. En España, el 27% de los casos catalogados con ELA<sup>f</sup> presentan mutaciones en C9orf72, y el 3% de los casos de la esporádica<sup>39,40</sup>.

Se han desarrollado tres hipótesis para establecer una relación causal entre la mutación de este gen y la patología. Por un lado, se plantea que debido a la expansión del hexanucleótido GGGGCC, se produzca una pérdida de función de C9orf72, y esto provoque el fenotipo patológico. Segundo, que, debido a la expansión, se produzca una alteración en la homeostasis del ARN y se secuestre en el núcleo. Por último, que se produzca una acumulación tóxica de proteínas, por la interacción entre las proteínas con la expansión y proteínas C9orf72 normales, formando un dipéptido sentido-sinsentido, que presente toxicidad celular. Estas tres hipótesis no son excluyentes entre sí<sup>32</sup>. Por el momento, se desconocen los mecanismos por los cuales la mutación en C9orf72 en ocasiones conlleva a sintomatología propia de la ELA, otras veces a sintomatología de DFT, y a veces, a un fenotipo mixto ELA-DFT<sup>32</sup> (**Cuadro 3**).

## Otros genes implicados

A continuación, en la **Tabla 1** se detallan otros genes que se han encontrado alterados en pacientes con ELA.

| Locus    | Gen (Proteína)   | Herencia | Mecanismo patológico implicados           |
|----------|--|----------|---|
| ALS2     | ALS2 (Alsina)  | AR       | Tráfico endosomal                         |
| ALS4     | SETX (Senataxina)  | AD       | Metabolismo del ARN                       |
| ALS8     | VAPB (Proteína B/C asociada a proteínas de membrana asociadas) | AD       | Estrés en RE                              |
| ALS9     | ANG (Angiogenina)  | AD       | Metabolismo del ARN                       |
| ALS11    | FIG4 (Polifosfatidil inositol fosfatasa)                       | AD       | Tráfico endosomal                         |
| ALS12    | OPTN (Optineurina)   | AD/AR    | Autofagia                                 |
| ALS13    | ATXN2 (Ataxina 2)  | AD       | Metabolismo ARN                           |
| ALS14    | VCP (Proteína que contiene valosina/ p97)                      | AD       | Autofagia                                 |
| ALS15    | UBQLN2 (Ubiquilina 2)  | XD       | Sistema proteosoma-ubiquitina y autofagia |
| ALS16    | SIGMAR1 (receptor intracelular no-opioide tipo 1)              | AD       | Sistema proteosoma-ubiquitina y autofagia |
| ALS17    | CHMP2B (Proteína corporal multivesicular cargada 2B)           | AD       | Tráfico endosomal                         |
| ALS18    | PFN1 (Profilina 1)   | AD       | Citoesqueleto                             |
| ALS19    | ERBB4 (Receptor tirosina proteína quinasa erbB4)               | AD       | Desarrollo neuronal                       |
| ALS20    | HNRNPA1 (Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1)            | AD       | Metabolismo ARN                           |
| ALS21    | MATR3 (Matrina 3)  | AD       | Metabolismo ARN                           |
| ALS22    | TUBA4A (Tubulina $\alpha$ 4A)                                  | AD       | Citoesqueleto                             |
| ALS-DFT2 | CHCHD10 (Proteína N27C7-4)                                     | AD       | Mantenimiento mitocondrial                |
| ALS-DFT3 | SQSTM1 (proteína p62)  | AD       | Autofagia                                 |
| ALS-DFT4 | TBK1 (Serin/treonin proteína quinasa TBK1)                     | /        | Autofagia                                 |

**Tabla 1. Otros genes implicados en la patología de la ELA.** AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva; XD: ligada al cromosoma X dominante. Adaptado de Hardiman et al. 2017

## Fisiopatología de la ELA

Como se acaba de comentar, a pesar de que se han identificado numerosos genes asociados con la ELA, la etiología de esta enfermedad es en gran medida desconocida<sup>28</sup> y sigue existiendo cierta controversia a la hora de explicar cómo y qué alteraciones celulares inician la patología<sup>41,42</sup>. En cualquier caso, sí que se han identificado una serie de mecanismo patogénicos convergentes en esta enfermedad que son comunes en todos los tipos de ELA, independientemente del tipo de inicio de ELA<sup>28</sup> (Figura 5).

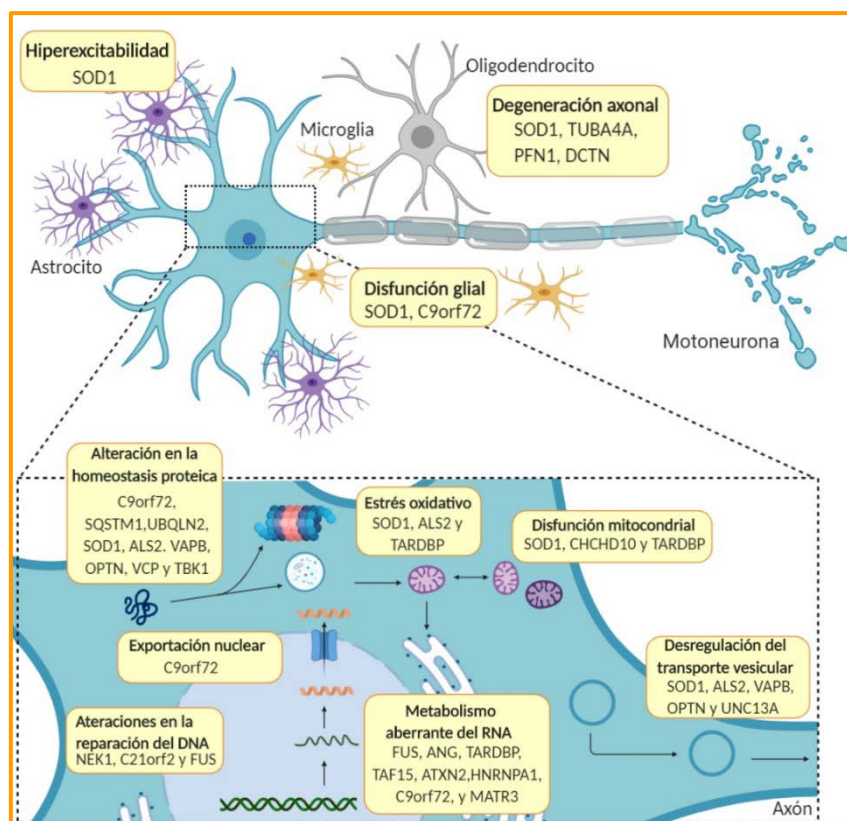


Figura 5. Esquema de la fisiopatología de la ELA y los genes implicados. Adaptado de Hardiman 2017

## Disfunción mitocondrial

El papel de la mitocondria en el metabolismo y la supervivencia celular es esencial. La mitocondria es responsable de la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa en la cadena de transporte de electrones, participa en la biogénesis de fosfolípidos, tiene un papel clave en la homeostasis del calcio y está implicada en la regulación de los procesos apoptóticos. Las neuronas, en comparación con otros tipos celulares, son especialmente sensibles a la disfunción mitocondrial, ya que presentan grandes requerimientos metabólicos. De hecho, el cerebro representa el 2% de la masa corporal y sin embargo utiliza el 20% del oxígeno que respiramos. Además del aporte energético, las mitocondrias desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la funcionalidad neuronal. Mediante el control de la homeostasis de calcio, participan en la modulación de las dinámicas de neurotransmisión. Por último, debido a que las neuronas son un tipo celular con una escasa tasa de recambio, estas células son especialmente susceptibles a la acumulación de daños derivados de la disfunción mitocondrial<sup>28</sup>.

Muchas de las alteraciones genéticas identificadas en la ELA son producidas en genes que codifican para proteínas con funciones mitocondriales. Además, se han identificado interacciones entre la mitocondria y otras proteínas que aparecen alteradas en esta enfermedad, como por ejemplo TDP43<sup>28,43</sup>. Entre los eventos patológicos identificados en la ELA encontramos **defectos en la producción de ATP** debido a una disfunción en la cadena de transporte de electrones, defectos observados tanto en pruebas funcionales en pacientes como en muestras de músculo *post-mortem* de pacientes con ELA<sup>44-47</sup>. Además, en los modelos experimentales se han encontrado hallazgos similares<sup>48</sup>. En modelos de SOD1 se ha encontrado una alteración en la síntesis de ATP. Concretamente, debido a mutaciones en SOD1, esta proteína agrega y se acumula en

el espacio intermembrana de las mitocondrias<sup>41,49</sup>, lo que provoca una disminución de la actividad en la cadena de transporte de electrones<sup>28,50</sup>. También interfieren en la actividad de los canales voltaje dependiente VDAC1, que son responsables de la interacción del ATP y el ADP con la membrana mitocondrial externa. En un modelo de ELA asociada a SOD1 en ratas, el complejo SOD1 y VDAC1 produjo una disminución de la permeabilidad del ADP. Por otro lado, también se ha observado en modelos celulares basados en las mutaciones de TDP43 una disfunción en la cadena de transporte de electrones, una disminución de los niveles de ATP y una disminución en el consumo de oxígeno. A consecuencia de la agregación de TDP43 dentro de las mitocondrias, se produce una alteración transcripcional que provoca el desensamblaje del complejo I de la cadena de transporte de electrones<sup>28,43</sup>.

Por otro lado, en la ELA existe una **dinámica mitocondrial de fusión-fisión aberrante**<sup>51</sup>. En condiciones fisiológicas, esta dinámica contribuye al intercambio de metabolitos entre las mitocondrias, favorece la disipación de variaciones en el potencial de membrana mitocondrial, y además facilita la movilización y aislamiento de fracciones mitocondriales dañadas. En modelos celulares de SOD1 y en modelos *in vivo* de TDP43, se han identificado mitocondrias de tamaño y forma aberrantes y una alteración en el balance de fusión-fisión<sup>28</sup>. Además, tanto en muestras de pacientes como modelos experimentales de ELA basados en las diferentes mutaciones, se observan daños estructurales a nivel mitocondrial o fragmentación de las mitocondrias en estadios muy iniciales de la enfermedad, lo que induce a pensar en la disfunción mitocondrial como una fuente de degeneración más que como consecuencia<sup>28</sup>. De hecho, exceptuando la toxicidad mediada por ARN, defectos en las mitocondrias están estrechamente relacionado con todos los eventos fisiopatológicos “no mitocondriales” que se dan en la ELA (excitotoxicidad, pérdida de la homeostasis proteica, defectos en el transporte axonal, etc.)<sup>28</sup>.

## Estrés Oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, por sus siglas en inglés) tienen un papel fisiológico como moléculas de señalización en diferentes procesos, como el crecimiento y proliferación celular y la modulación de la actividad de diferentes enzimas y canales iónicos<sup>28,52</sup>. Por ejemplo, el monóxido de nitrógeno (NO) está involucrado en la regulación de la neurotransmisión, plasticidad sináptica y modulación de los procesos neuroendocrinos. Además, diferentes células del cerebro producen NO de manera fisiológica, por ejemplo, para mantener el flujo cerebral normal<sup>52</sup>. Sin embargo, bajo condiciones patológicas, forman parte de los efectos deletéreos de numerosas enfermedades, incluida la ELA y otras END<sup>52</sup>. Bajo ciertas circunstancias, se produce un incremento exacerbado de la liberación de NO, por ejemplo por activación de la iNOS en células de microglía, lo que desencadena los procesos de EO<sup>52</sup>. Este exceso de NO puede producir superóxidos (ONOO<sup>-</sup>) y especies nitrificantes que interaccionan con diferentes sustratos celulares provocando peroxidación lipídica, daño oxidativo del ácido desoxirribonucleico (ADN), daño en proteínas y daño mitocondrial, entre otros. Esto provoca la activación de las vías de inflamación, excitotoxicidad, estrés en el retículo endoplasmático (RE), agregación proteica y muerte celular. De igual modo, estos sustratos celulares son susceptibles a la oxidación por parte de las ROS.

La principal fuente de sobreproducción de ROS se debe a la **disfunción en la fosforilación oxidativa** en la cadena de transporte de electrones. Por proximidad, las mitocondrias son muy susceptibles estas ROS<sup>28</sup>. Además, debido a la falta de

mecanismos reparadores, el ADN mitocondrial es especialmente sensible a las ROS. Por otro lado, la propia cadena de transporte de electrones y la ATPsintasa son muy susceptibles a las ROS. En el músculo, propio EO producido por exceso de producción de ROS en las mitocondrias produce una disfunción mitocondrial exacerbada, formando un círculo vicioso que produce desgaste muscular en el transcurso de la ELA<sup>53</sup>.

Se ha encontrado daño oxidativo en muestras de pacientes de ELA, al igual que en tejido post-mortem<sup>54-56</sup>. Además, en modelo animal de SOD1<sup>G93A</sup> se ha identificado daño oxidativo e ADN y ARN<sup>57</sup>. La propia SOD1 es muy susceptible a las ROS, y como consecuencia de su oxidación se produce mal plegamiento y agregación de esta proteína, lo que provoca su disfunción<sup>58</sup>. Esta disfunción desencadena de nuevo en el aumento de la producción de ROS y superóxidos. En el caso de TDP43, el daño oxidativo provoca agregación y deslocalización de TDP43 a los SG. La sobreexpresión de la TDP43 mutante provoca aumento de ROS y EO. En el caso de mutaciones de FUS, también se ha observado un aumento de los niveles de ROS<sup>28</sup>.

## Excitotoxicidad

Dentro de los eventos fisiopatológicos que ocurren en la ELA, la excitotoxicidad es el proceso del que más evidencias existen de una relación directa con la muerte de las MNs. En la ELA se produce una hiperexcitabilidad neuronal que provoca en último caso la muerte celular<sup>59,60</sup>. Esta respuesta excitatoria anómala se puede deber a diferentes motivos. Puede ser a consecuencia de un aumento inapropiado de la actividad presináptica, por una respuesta anormal de la célula postsináptica al estímulo excitatorio, que varía su propia excitabilidad, o debido a una combinación de ambas<sup>59</sup>. Existe una fuerte evidencia de que defectos en la neurotransmisión excitadora tienen un papel clave en la progresión de esta enfermedad. Esto puede deberse a diferentes factores:

Por un lado, una de las principales causas de la excitotoxicidad es la **desregulación del metabolismo del glutamato**. La transmisión glutamatérgica depende de factores como los niveles de glutamato, los mecanismos de recaptura y resíntesis, el balance excitatorio/inhibitorio y los umbrales de disparo individuales de las neuronas, proceso dependiente de la expresión de receptores de glutamato. Una alteración en cualquiera de estos eventos, puede producir una modificación en el control de la transmisión, y generar excitotoxicidad<sup>59</sup>. Se ha observado en pacientes de ELA evidencias de una alteración en la señalización glutamatérgica, principalmente mediante pruebas de electrofisiología que demuestran alteraciones en las MNs corticales (superiores) y espinales (inferiores)<sup>47</sup>. Además, se ha encontrado en biopsias de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes una alteración en los niveles de glutamato<sup>59,61</sup>. Podemos clasificar la excitotoxicidad mediada por glutamato en función de los mecanismos responsables de esta respuesta exacerbada.

Por un lado, hablamos de excitotoxicidad directa o clásica (Excitotoxicidad por sobreestimulación), cuando la degeneración neuronal se produce debido a un aumento repentino y patológico de los niveles de glutamato. El aumento prolongado de glutamato extracelular se puede producir por dos mecanismos. Por una parte, este aumento puede ser debido a alteraciones en los mecanismos de recaptura impiden una rápida homeostasis de los niveles de glutamato. Esta recaptura se lleva a cabo tanto por las neuronas como por las células de glía. El receptor principal de recaptura en astrocitos es el transportador de aminoácidos excitatorios 2 (EAAT2). En pacientes de ELA se ha encontrado una deficiencia de este

receptor en corteza y médula espinal<sup>62</sup>. Asimismo, existen evidencias de disminución de la expresión de los transportadores de glutamato EEAT1 y EEAT2 de los astrocitos<sup>62,63</sup> (**Cuadro 4**), lo que incrementa el tiempo de permanencia del NT en la hendidura sináptica, manteniendo en el tiempo su acción excitatoria. Por otra parte, se puede producir un incremento en la propia liberación de glutamato a la brecha sináptica. Este exceso de liberación de glutamato puede deberse a otros factores, como alteraciones en la liberación de calcio por parte del retículo endoplasmático, o malfuncionamiento de las proteínas efectoras de calcio<sup>50,59</sup>.

Por otro lado, otra de las causas de hiperexcitabilidad puede ser la **alteración de los circuitos inhibitorios** mediados por las interneuronas. Se ha observado una disfunción en la señalización GABAérgica tanto en modelos animales como en muestras de pacientes<sup>60,64</sup>. Además, se han relacionado los procesos de hiperexcitabilidad con **alteraciones en la expresión y funcionalidad de canales iónicos**. En el modelo animal de SOD1 basado en la mutación G93A, se ha observado un incremento de las corrientes de Na<sup>+</sup> persistentes<sup>65</sup>. En condiciones fisiológicas, estas corrientes disminuyen el umbral de despolarización de las neuronas, lo que facilita los trenes de potencial de acción repetitivos. En el modelo de SOD1, estas corrientes se encuentran incrementadas, y si bien el umbral no varía, sí su amplitud, favoreciendo la excitabilidad. Además, se ha observado una reducción de la conductancia de los canales de K<sup>+</sup>, tanto en modelos animales como en pacientes. Esto hace que la entrada de Na<sup>+</sup> en la neurona no se vea contrarrestada por la salida de K<sup>+</sup>, lo que altera la homeostasis iónica de la neurona<sup>65</sup>, y por tanto implica un proceso de hiperexcitabilidad en estas neuronas. En este caso, definiríamos este tipo de excitotoxicidad como excitotoxicidad indirecta o lenta (Excitotoxicidad por sobre-reacción). A grandes rasgos, este tipo de excitotoxicidad ocurre cuando se produce una respuesta exacerbada a niveles subtóxicos de glutamato. Este tipo indirecto responde a alteraciones en los umbrales de inhibición o excitación de las neuronas, disrupción de canales iónicos o alteración en la funcionalidad de receptores. La excitotoxicidad lenta es la más común en las END<sup>50,59</sup>. La excitotoxicidad por sobre-reacción tiene diverso origen. Por un lado, en la ELA, ciertas poblaciones de MNs presentan una disminución en la expresión de las proteínas de unión a Ca<sup>2+</sup>. Esto explica la susceptibilidad selectiva que tienen las MNs a degenerar debido a esta patología<sup>66</sup>. Los defectos en los sistemas de tamponamiento de Ca<sup>2+</sup> hacen a estas MNs más dependientes de la regulación de los niveles de calcio por parte de las mitocondrias, y por lo tanto, especialmente susceptibles al daño mitocondrial<sup>50,67</sup>.

Las interneuronas también regulan los niveles de Ca<sup>2+</sup> mediante proteínas de unión a calcio. De hecho, estas neuronas se clasifican en función de su expresión de proteínas de amortiguación de calcio (calretinina, parvalbúmina, calbindina, etc.). En un modelo de SOD1 se observó una pérdida de interneuronas calbindina y parvalbúmina positivas en médula espinal, y calretinina positivas en corteza cerebral, lo que podría indicar un fallo en la regulación de la sinapsis por parte de estas<sup>59</sup>.

En estadios presintomáticos en el modelo de SOD1<sup>G93A</sup> se ha observado una reducción en la capacidad de almacenamiento de calcio por parte de las mitocondrias en el SNC<sup>50,68,69</sup>, lo que de nuevo parece indicar que fallos en la capacidad amortiguadora de calcio participan en la fisiopatología de la ELA. Se ha observado en estos animales un retraso en la recuperación de los niveles basales de calcio después de una activación del receptor AMPA<sup>28</sup>. Esto puede ser debido a la pérdida de comunicación RE-mitocondria: la mitocondria no almacenar el calcio procedente del RE, por lo que se acumula en el citosol. Este evento aparece de manera generalizada en la ELA<sup>70,71</sup>.



Se ha relacionado la excitotoxicidad mediada por glutamato con la activación de los receptores AMPA/KA. Estos receptores se componen de 4 subunidades GluR1-4, que confieren al receptor de diferentes características funcionales. Concretamente, la carencia de la subunidad GluR2 aumenta la permeabilidad del receptor al ión  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto, la vulnerabilidad de las MNs a los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  depende del patrón de expresión de los receptores AMPA permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>67</sup>. Se ha identificado en la ELA una alteración en el patrón de expresión de la subunidad GluR2 en los receptores glutamatérgicos debido a alteraciones transcripcionales, por lo que bajos niveles de la subunidad GluR2 participan en los procesos de excitotoxicidad que aparecen en esta enfermedad<sup>72</sup>. Los astrocitos son capaces de alterar la expresión neuronal de GluR2, y de este modo regular la cantidad de receptores AMPA permeables a calcio que tienen las MNs, modulando así la respuesta excitatoria<sup>73</sup>. Esta capacidad se ve mermada en ciertos casos de ELA, ya que los astrocitos no son capaces de ejercer ese papel neuroprotector<sup>50,73</sup>. Además, tanto el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) modulan la expresión de GluR2<sup>50</sup>.

Por último, cabe mencionar el papel del  $\text{K}^+$  en la desregulación de la excitabilidad neuronal. Dos de los síntomas más comunes en esta patología son los calambres y las fasciculaciones. Estas se producen debido a descargas espontáneas aberrantes de la MN inferior sobre la fibra muscular que inerva. Estas descargas espontáneas se relacionan con **alteraciones en la homeostasis de potasio**<sup>60</sup>. Aunque se producen fasciculaciones de manera fisiológica en músculos sanos, el patrón de disparo de estas es diferente. En la ELA, estas fasciculaciones pueden aparecer en músculos que todavía no están clínicamente debilitados<sup>59</sup>, lo que propone a la hiperexcitabilidad como un mecanismo patológico primario en esta enfermedad. Los astrocitos funcionan como equilibradores de los niveles de  $\text{K}^+$  en el espacio extracelular mediante diversos mecanismos, entre ellos los canales de potasio  $\text{K}_{\text{ir}}4.1$ . Se ha visto una alteración de estos canales en el modelo de SOD1<sup>74</sup>.

Por último, cabe mencionar que la importancia de la excitotoxicidad en la ELA es tal, que el principal fármaco aprobado como tratamiento, el Riluzol, basa su eficacia en su capacidad de reducir la excitotoxicidad, principalmente al inactivar de los canales de sodio dependientes de voltaje en los terminales nerviosos glutamatérgicos en la MN superior<sup>50,59,60,75</sup>.

## Neuroinflamación

Debido a la complejidad funcional del SNC, los pequeños cambios en el microambiente (alteraciones en pH, perturbaciones en el metabolismo, etc.) tienen fatídicas consecuencias a nivel funcional. Por ello, este sistema precisa de una exquisita regulación para el control de la homeostasis, y una rápida respuesta frente a potenciales daños. El SNC cuenta con un sistema inmune residente propio, compuesto principalmente de células de respuesta inmune innata, la microglía, que es la célula mieloide principal (conforma el 5-15% de las células del cerebro) y se responsabiliza del mantenimiento y homeostasis tisular<sup>76</sup>. Además, la microglía tiene un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, la microglía aparece como primera línea de defensa a la hora de responder a cualquier alteración en el ambiente celular<sup>77</sup>. Estas células están altamente especializadas, y a su vez son extremadamente plásticas, de modo que reaccionan de manera inmediata ante cualquier cambio en la homeostasis del tejido nervioso<sup>76,77</sup>. Tras una lesión, la microglía se convierte en reactiva y migra a las áreas dañadas, donde libera citocinas pro- y anti- inflamatorias y factores neurotróficos, a la vez que participa en varias funciones incluida la reducción de radicales libres, todo ello para mitigar el daño<sup>76-79</sup> (**Cuadro 5**). De hecho, las sustancias liberadas por las propias neuronas en procesos de degeneración activan la

microglía y provocan cambios genéticos a largo plazo que modifican el fenotipo de estas células<sup>78,80</sup>. Por lo tanto, a pesar de que las células responsables de la respuesta inflamatoria son principalmente la microglía y en menor medida los astrocitos, las propias neuronas participan en los procesos inflamatorios. Además, a través de la fagocitosis, la microglía participa en la eliminación de patógenos y desechos producidos por el daño celular<sup>77</sup>.

Sin embargo, la liberación de productos proinflamatorios como consecuencia de la activación de la microglía, especialmente cuando se cronifica, puede dañar neuronas sanas, y con ellos causar disfunción sináptica y muerte neuronal. Los astrocitos y la microglía activada liberan citoquinas proinflamatorias que reclutan más células de microglía, lo que

#### **Cuadro 4. EL ASTROCITO EN LA ELA**

Los astrocitos son las células neurales mayoritarias en el SNC incluyendo las neuronas. Estas células gliales tienen una función esencial en el mantenimiento del cerebro sano, tanto por su control de la homeostasis iónica y de los niveles de NTs, como por el soporte metabólico que ejercen con su aporte de nutrientes a las neuronas, y su implicación en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BHE). Los astrocitos liberan factores neurotróficos y son responsables de amortiguar los niveles de glutamato en la sinapsis, protegiendo así a las neuronas de un exceso de estimulación<sup>85,586</sup>. Además, los astrocitos liberan precursores de glutatión (CysGly) que la neurona utiliza para sintetizarlo y protegerse del EO<sup>658</sup>. Precisamente su papel en el mantenimiento de la homeostasis de glutamato y su aporte de nutrientes son sus principales acciones beneficiosas en los estadios iniciales de esta enfermedad. En condiciones fisiológicas, mediante los receptores astrocitarios de glutamato EAAT2, los astrocitos recogen el exceso de este NT de la brecha en un proceso dependiente de ión Na<sup>+</sup>. Si este proceso falla, se produce un exceso de estimulación neuronal, lo que aumenta la frecuencia de disparo de las neuronas, dando lugar a un proceso de excitotoxicidad.

En modelos de **ELA asociada a SOD1**, se ha observado que el transportador de glutamato EAAT2 está regulado a la baja en astrocitos. Este proceso es mediado por caspasa3, responsable de la rotura del transportador en dos fragmentos. Estos fragmentos se acumulan en el núcleo de los astrocitos, provocando una desregulación de la expresión génica. Los principales genes afectados están relacionados con la mitocondria y la respiración celular, lo que desencadena un daño mitocondrial que, en consecuencia, provoca la pérdida de amortiguación de calcio por parte de estos orgánulos, aumentando los niveles de especies reactivas de oxígeno. Mutaciones de EAAT2 en el sitio de corte de la caspasa 3 retrasa la progresión de la enfermedad y extiende la supervivencia de los ratones SOD1<sup>659</sup>.

En modelos de **ELA asociada a TDP43 y C9orf72** también se ha visto una implicación directa del astrocito en la patogenia de la enfermedad. En el caso de C9orf72, se ven afectados el metabolismo de ARN en astrocitos, debido a que agregados de péptidos poliprolina-arginina se unen a otros ARNm del núcleo alterando el empalme y transporte de ARN al citoplasma, lo que altera la transcripción proteica, viéndose mermada la flexibilidad metabólica de estas células, e inhibición del proteosoma. Además, al igual que en los casos de SOD1, se ha visto en estos astrocitos una disminución en el metabolismo del glucógeno, lo que altera el aporte energético del astrocito a la MN, y una disminución de los transportadores de glutamato, lo que desencadena procesos de excitotoxicidad. **En el caso de TDP43**, se ha identificado la aparición de SG dentro de los astrocitos, contenientes de agregados de TDP43, ubiquitina y  $\alpha$ -sinucleína mayoritariamente<sup>85</sup>.

El papel del astrocito en la inflamación: Aunque los astrocitos no son células del sistema inmune, participan activamente en la respuesta inflamatoria. Los astrocitos y la microglía están estrechamente relacionados en cuanto a que son capaces de regular su activación de manera recíproca. De esta forma, la microglía activada (fenotipo M1) es capaz de activar al astrocito mediante la liberación de citoquinas, produciendo una transformación de este a fenotipo A1<sup>586,635</sup>. De manera similar, se ha visto como el astrocito es capaz de modular la activación microglial, lo que provoca que esta libere glutamato por las uniones estrechas de tipo GAP<sup>83</sup>. Además, los astrocitos, mediante la liberación del factor trófico TGF- $\beta$ , son capaces de suprimir la activación de la microglía citotóxica<sup>586</sup>. Bajo condiciones patológicas, los astrocitos responden cambiando su morfología y función, liberando citoquinas pro- y antiinflamatorias, prostaglandinas D2, factores de crecimiento, quimioquinas, interferón, componentes de la matriz extracelular, etc. para tratar de mitigar el daño. Sin embargo, este cambio de fenotipo tiene un papel dual. Por un lado, esta respuesta es protectora, ya que la formación de la cicatriz glial sirve de muro de contención que limita la expansión del daño y previene la infiltración del sistema inmune. Sin embargo, la liberación de componentes de la matriz extracelular para la formación de la cicatriz glial puede tener como consecuencia, la inhibición del crecimiento axonal y su capacidad regenerativa.

Debido a la importancia que tiene la respuesta astrocitaria y su efecto sobre las neuronas, varios estudios han intentado establecer una relación más directa entre el astrocito y la fisiopatología de esta enfermedad, llegando a la robusta conclusión de que existe un mecanismo no autónomo por el cual las MNs perecen en la ELA, ya que han podido comprobar el efecto directo que tienen los astrocitos en la muerte neuronal<sup>88,660,661</sup>.



produce la propagación de la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, un desequilibrio entre funciones proinflamatorias y reparadoras puede conllevar a daño en el SNC. Esto es lo que ocurre en ciertas patologías, como es el caso de las END.

En la ELA, la neuroinflamación se desarrolla por la interacción entre microglía, neuronas y astrocitos, formando un círculo vicioso en el que el astrocito es diana, pero a la vez fuente de neuroinflamación. Los astrocitos son activados por los mediadores inflamatorios liberados por la microglía, lo que como resultado produce una reducción en la expresión de factores neurotróficos por parte de estos, y además una liberación de mediadores inflamatorios adicionales, que reclutan y activan más células de microglía<sup>81</sup>. Dado que la muerte de las MNs es la consecuencia principal de esta enfermedad, inicialmente los esfuerzos en investigación se centraron en estudiar los efectos que tiene la ELA sobre estas neuronas. Sin embargo, el uso de modelos animales ha permitido identificar alteraciones y mecanismos patogénicos en otros tipos celulares<sup>82</sup>, e incluso se ha podido establecer una relación entre la implicación de estas células y la severidad de la patología<sup>83–86</sup>. Este descubrimiento se apoya en el hecho de que muchos de los genes que, o bien están identificados como causantes de esta enfermedad, o están sobre expresados en la patología, codifican para proteínas que ejercen su función en diferentes tipos celulares como son las células de glía. Por lo tanto, esta enfermedad es altamente compleja, y en su patogénesis no sólo participan las neuronas, sino que otros tipos celulares ejercen un papel crucial en los procesos de muerte de las MNs, a través del llamado **“efecto celular no autónomo”**<sup>85,87,88</sup>.

En la mayoría de las END, incluida la ELA, la respuesta inflamatoria se caracteriza principalmente por una respuesta inmune innata<sup>76,77</sup>, predominando esta sobre la respuesta inmune adquirida. Tanto es así, que, en estadios tempranos de esta enfermedad, se produce una activación de la **microglía** y los **astrocitos**, con una mínima infiltración de células de sistema inmune periférico. Aun así, en estadios avanzados de la enfermedad se ha observado un proceso de inflamación sistemática generalizada<sup>77</sup>. La inflamación aparece como uno de los marcadores patológicos mayoritarios de esta enfermedad. En tejido nervioso procedente de muestras *post-mortem* de pacientes, se ha encontrado un incremento de poblaciones de microglía y astrocitos, así como linfocitos CD4 y CD8 positivos, en áreas que presentan degeneración de las MNs<sup>81</sup>. Sin embargo, la microglía activada no solo aparece en las zonas más afectadas, sino que también la podemos encontrar en zonas de lesión más leve. Esto podría indicar, bien que la microglía funciona como un sensor temprano del estrés neuronal, o bien que la propia microglía desencadena el proceso de muerte neuronal. Por otro lado, se ha observado en tejido *post-mortem* un incremento notable de la expresión de la enzima COX-2 y altos niveles de ARNm de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)<sup>67,89</sup>. Este incremento de factores inflamatorios se observa en pacientes que se encuentran en fases iniciales de la enfermedad, así como en fases presintomáticas de ciertos modelos experimentales<sup>85,90</sup>. Además, con el transcurso de la patología, se intensifican los procesos neuroinflamatorios. Se ha localizado la sobreexpresión de la enzima COX-2 principalmente en macrófagos y microglía<sup>89</sup>, lo que de nuevo pone de manifiesto la participación de estas células en la fisiopatología de la ELA.

Por otro lado, tanto en los pacientes como en los modelos experimentales de ELA, muestran una sobreexpresión del receptor de adenosina P2X<sub>7</sub>, receptor responsable de la liberación de interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ )<sup>89,91</sup>. Este receptor se activa por el ATP liberado por células estimuladas con iniciadores de la inflamación, y como consecuencia, produce la liberación de IL1 $\beta$ . Por otro lado, la muerte celular por apoptosis y necrosis también es fuente de ATP, lo que incrementa aún más la liberación de esta citoquina proinflamatoria. La citoquina IL1 $\beta$ , junto con el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , por sus

siglas en inglés), inducen la expresión de la enzima COX-2 y con ello la síntesis de prostaglandinas PGE<sub>2</sub> y ROS. En este sentido, tanto las prostaglandinas, por que estimulan la liberación de glutamato en astrocitos, como las ROS sintetizadas por parte de las células de microglía, participan en la propagación de la inflamación y el EO<sup>67</sup>, provocando más muerte celular, y con esta, aumento de la liberación de ATP, lo que perpetúa el ciclo inflamatorio. Además, se ha visto que la molécula de ATP funciona como quimio atrayente de la microglía hacia la zona de lesión<sup>92</sup>.

#### Cuadro 5. MICROGLÍA EN LA ELA

Se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales la activación de la microglía contribuye a la patogénesis de la ELA. Por un lado, se ha descrito en modelos experimentales de **ELA asociada a mutaciones en SOD1** que la microglía va sufriendo modificaciones a lo largo del transcurso de la enfermedad<sup>77</sup>. Así, en estadios presintomáticos, así como en el debut de los primeros síntomas, la microglía sufre una activación hacia fenotipos antiinflamatorios y comienza a expresar marcadores del **fenotipo M2**, como CD206 o citoquinas antiinflamatorias como la interleuquina 10 (IL10). Sin embargo, a medida que progresa la enfermedad, y cuando esta está muy avanzada, se produce un cambio de expresión de marcadores, hacia aquellos con propiedades tóxicas, que promueven la muerte celular<sup>90,566,583,584</sup>. Estos marcadores son típicos de un fenotipo proinflamatorio y tóxico, también llamado **fenotipo M1**. La microglía M1 que presenta mutaciones en SOD1 tiene exacerbado su potencial excitotóxico, por lo que es excesivamente sensible a los estímulos inflamatorios<sup>662</sup>. Por otro lado, el complejo proteico NF kappa B (NFkB) juega un papel crucial en el control de la inflamación, y está sobre expresado en pacientes de ELA y en el modelo de SOD1 mutado (mSOD1)<sup>85</sup>. Se ha visto que la inhibición de la vía inflamatoria NFkB en microglía aumenta la supervivencia de los ratones al interrumpir la activación proinflamatoria de estas células. Además, se ha establecido la relación entre los agregados de SOD1 y la activación de la microglía por medio de los receptores toll-like (TLRs, por sus siglas en inglés). La activación de la microglía, a su vez, activa las células circundantes, lo que desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias, y ROS y RNS, que conduce a la muerte de la neurona motora<sup>77,86</sup>. Por último, también se ha propuesto que la expresión de SOD1 en la microglía produce un fenotipo celular con la motilidad deteriorada, por lo que se ve comprometida su capacidad fagocítica. Deficiencias en este proceso podrían conducir a la acumulación de agregados proteicos (como SOD1, TDP43 y FUS)<sup>86</sup>.

En **estudios con modelos de ELA basados en TDP43**, se ha visto que, tanto formas mutantes de TDP43, como un exceso de expresión intracelular de esta proteína, provocan un incremento en la respuesta inflamatoria en la microglía<sup>90</sup>. El receptor CD14 de la superficie de la microglía es capaz de reconocer a la proteína TDP43, desencadenando una liberación de citoquinas proinflamatorias<sup>85</sup>. Además, tanto las proteínas TDP43 como FUS son también capaces de inducir procesos inflamatorios vía activación de NFkB<sup>86,663</sup>. En los casos de ELA asociada a mutaciones TDP43, se ha especulado mucho con el papel que tiene la activación de la microglía en la enfermedad, ya que en ocasiones puede tener una función beneficiosa, como la de limpieza del TDP43 patológico<sup>664</sup>, por lo que sería interesante poder desarrollar estrategias terapéuticas que se centrasen en la modulación de esta activación hacia fenotipos neuroprotectores.

También se ha estudiado el papel de la microglía en **ELA asociada a mutaciones en C9orf72**. La mutación de C9orf72 tiene como resultado una disminución de los niveles de esta proteína. Se ha observado en ratones, que la eliminación de C9orf72 deteriora la capacidad fagocítica de la microglía, particularmente afectando la maduración del lisosoma<sup>86</sup>. Cabe pensar que esto repercute directamente en la función de eliminación de agregados proteicos.

#### Agregación proteica en el citoplasma

Como ya se ha mencionado con anterioridad, una de las características más frecuente en la ELA es la presencia de agregados proteicos en el citoplasma de las MNs afectadas. Resulta llamativo que, a pesar de encontrarse agregados proteicos de muy variada composición, como son las proteínas que codifican los genes HNPNA1, PFN1, UBQLN2, OPTN, FUS, TARDBP, etc., la alteración de estas proteínas no es estrictamente necesaria, y en la enfermedad aparecen mutaciones de estos genes en un número muy reducido de pacientes. Las inclusiones ubiquitinadas son las más abundantes en la ELA<sup>93</sup>. Estos agregados aparecen tanto en las MNs como en las células de glía circundantes. Los primeros en identificarse fueron

los agregados de la proteína SOD1, pero con el avance de la investigación y el descubrimiento de nuevos factores y genes implicados en la ELA, se han encontrado numerosas proteínas que participan en este evento fisiopatológico.

Existen muchas hipótesis sobre cuáles son los mecanismos por los que ciertas proteínas agregan en esta patología. TDP43, FUS y otras proteínas de unión a ARN (RBP, por sus siglas en inglés), presentan dominios ricos en asparagina, glutamina, tirosina o glicina que les confiere susceptibilidad a agregarse, permitiéndoles adoptar dos estados conformacionales, plegados o desplegados. En los estados plegados, estas proteínas tienen la capacidad de secuestrar a otras proteínas y formar agregados. De este modo, la agregación se propaga de manera similar a la del prion en las enfermedades priónicas<sup>94</sup>.

Aunque existe cierta controversia, y aún quedan pendientes de esclarecer ciertos aspectos de este evento fisiopatológico, uno de los mecanismos más aceptados es que la agregación proteica, tanto de TDP43 como de FUS, puede surgir por **alteraciones de la dinámicas y función de los SG**. Las RBP regulan la traducción local de ARNm de diversas proteínas. De esta forma, se crean unos complejos granulares de ARN-proteína en los que la traducción se reprime. Se pueden distinguir varios tipos de gránulos de ARN: SG, cuerpos de procesamiento (PB) y los llamados gránulos neuronales o de transporte. Los SG o PB se forman tras el desensamblaje de polisomas en respuesta al estrés, mientras que los gránulos neuronales sirven en el transporte de ARNm a su sitio de traducción local<sup>94</sup>.

FUS, TDP43 y ATXN2 están implicados en la formación de SG y hay evidencia de que las alteraciones en la formación de SG están asociadas con proteínas mutantes asociadas a la ELA. Resulta interesante que, a pesar de que la presencia de agregados de TDP43 es un marcador característico de la ELA, se han encontrado agregados de esta proteína en otras END, como Alzheimer o Ataxias espinocerebelosas de tipo 2 (SCA2)<sup>94</sup>.

Otra posible causa de la agregación proteica en esta enfermedad es la **alteración en las vías de degradación de las proteínas**. El cerebro es un órgano especialmente dependiente de los sistemas de proteólisis para mantener la homeostasis celular. Concretamente, los procesos de autofagia juegan un rol determinante en este aspecto. Debido a que las neuronas son células post-mitóticas, no pueden diluir las acumulaciones citoplasmáticas tóxicas mediante los procesos de mitosis, por lo que, si la proteólisis falla, acumulan en el citosol el material dañado durante toda la vida de la neurona<sup>95,96</sup>. Además, son células altamente polarizadas, en las que el sistema de autofagia se localiza a diferentes niveles celulares. En particular, los autofagosomas pueden generarse a lo largo de toda la neurona, mientras que los lisosomas se concentran en el área perinuclear<sup>95</sup>. Esto hace que las neuronas sean particularmente sensibles a defectos en el transporte que conlleven a la acumulación de agregados o componentes citosólicos dañados. Por lo tanto, a diferencia de otras células, en las que los procesos de autofagia son inducidos como respuesta a un estrés celular, las neuronas precisan de una autofagia constitutiva para el mantenimiento de la homeostasis celular<sup>95-97</sup>.

Existen dos vías de eliminación de depósitos proteicos que controlan la calidad de los componentes celulares y el mantenimiento de la homeostasis: el sistema Ubiquitín-proteosoma (UPS), responsable principalmente de degradar proteínas nuevas en citoplasma y núcleo; y la vía autofagia-lisosoma, responsable de digerir proteínas viejas y organelas defectuosas en el citoplasma<sup>97</sup>. A pesar de que ambas estrategias de degradación son capaces de eliminar sustratos ubiquitinados, la autofagia es el único mecanismo para eliminar los grandes agregados proteicos, así como orgánulos

deteriorados que son demasiado grandes para el proteosoma<sup>96</sup>. El equilibrio entre los sistemas proteolíticos es esencial en neuronas, y su disfunción contribuye a la patogénesis en las enfermedades neurodegenerativas. De hecho, se han observado mecanismos compensatorios en modelos animales de neurodegeneración<sup>98,99</sup>.

Uno de los mecanismos de autofagia es la autofagia mediada por chaperonas. Las chaperonas ayudan al plegamiento proteico en condiciones fisiológicas y evitan la agregación de proteínas en respuesta al estrés. Además, están involucradas en la degradación de los agregados cuando estos se producen. Se ha propuesto que la acumulación de TDP43 puede producirse debido a un defecto a las chaperonas en pacientes con ELA<sup>94,97</sup>. Además, se han observado acúmulos de autofagosomas y autolisosomas positivos para el marcaje p62/SQSTM1 cerca de inclusiones citoplasmáticas, lo que podría indicar un defecto en las vías de autofagia por alteraciones en la digestión lisosomal<sup>100</sup>. Asimismo, otros autores han observado que la sobreexpresión del complejo p62/SQSTM1 reduce la agregación de TDP43 en un proceso dependiente de proteosoma y autofagia<sup>101</sup>.

Otro de los componentes de la vía de degradación proteica es el proceso de ubiquitinación. Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas que forman agregados en ELA están ubiquitinadas; sin embargo, esta sobreexpresión y sobreacumulación es tan abundante, que satura el mecanismo de sistema UPS. Debido a esto, se ha observado un aumento de la autofagia en ciertos modelos de ELA<sup>102</sup>, lo que podría considerarse como un efecto compensatorio<sup>103</sup>. En conclusión, los componentes de las vías de degradación de proteínas parecen ser importantes moduladores de la agregación de proteínas y la toxicidad en la ELA. Además, se han asociado mutaciones en varios genes que codifican estos componentes con la ELA, lo que indica un papel causal en la enfermedad<sup>94</sup>.

Recientemente han surgido nuevas hipótesis acerca de la formación de **agregados de la proteína TDP43 y su relación con los micronúcleos**. Los micronúcleos son pequeños cuerpos de cromatina extranuclear rodeados por una envoltura nuclear y localizados en las inmediaciones del núcleo. Surgen en la división celular y están originados por errores en la segregación cromosómica durante la mitosis<sup>104,105</sup>. Recientemente se han relacionado estas formaciones con las END, ya que se han observado micronúcleos en muestras de tejido nervioso de pacientes de Alzheimer y Parkinson, así como en pacientes diagnosticados de ELA<sup>104</sup>. Se ha visto que, durante la formación de micronúcleos inducida por estrés, se producen inclusiones de TDP43 dentro de estos. De la misma manera que en los SG se convierten en inclusiones de proteínas, en el interior de los micronúcleos se puede generar un microambiente en el que la homeostasis proteína/ARN se ve alterada, lo que conduce a una fragmentación aberrante de TDP43 y la consecuente inducción a la agregación. Posteriormente, debido a la pérdida de la permeabilidad de la membrana del micronúcleo, se produce la liberación de su contenido al citoplasma. Se postula este mecanismo de agregación como evento temprano en el proceso patogénico de la ELA, debido a la baja presencia de estas estructuras en las etapas avanzadas de ELA<sup>104</sup>.

## Defectos en el procesamiento y estabilidad del ARN

El procesamiento del ARN es un proceso especialmente importante en el sistema nervioso, tanto que alteraciones en este proceso o en alguno de sus elementos reguladores están estrechamente relacionadas con las END<sup>106</sup>. Durante la biosíntesis de ARNm, el ARN sufre una serie de procesos de ensamblaje y remodelación esenciales, en los que la actividad reguladora

de las RBP juega un papel clave. Algunas de las RBP más abundantes en el núcleo contienen ciertos motivos estructurales, como motivos de reconocimiento de ARN (RRM, por sus siglas en inglés), dedos de zinc, que unen ARN, así como regiones auxiliares o de baja complejidad (LC), compuestas por una serie de aminoácidos específicos de cada proteína (**Cuadro 2**). Las regiones LC son susceptibles a plegamiento y son zonas clave en la aparición de mutaciones asociadas a la patología<sup>106</sup>.

Debido a que las dinámicas de interacción proteína-proteína son cruciales para el ensamblaje y desensamblaje de los complejos RBP-ARN, cabe pensar que mutaciones en estas regiones de interacción podrían resultar en perturbaciones en la homeostasis de proteínas y el ensamblaje del ARN. Concretamente, muchos de los genes que aparecen alterados en la ELA, son precisamente genes que codifican para RBPs (como FUS, TDP43, ATXN2, etc.). Además, se ha propuesto que en el caso de la mutación C9orf72, esta expansión se transcribe en ARNs que interrumpen el splicing.<sup>106,107</sup>

### Alteraciones en el transporte axonal

El citoesqueleto, junto a otros elementos, se encarga del tráfico, señalización y anclaje celular jugando un papel determinante en los procesos de transporte axonal. Las MNs, especialmente las espinales, se caracterizan por la presencia de largos axones, siendo las neuronas con los axones más largos del cuerpo humano. Esta característica las hace especialmente vulnerables a los defectos en las proteínas del citoesqueleto, ya que de este depende la comunicación entre la corteza motora y la placa motora, primero a través de las MNs superiores, que conectan corteza motora con médula espinal, y en segundo lugar a través de las MNs inferiores, que conectan directamente con la placa motora. Por lo tanto, alteraciones en el citoesqueleto a diferentes niveles, ya sea en los filamentos de actina, los filamentos de tipo intermedio, o los microtúbulos, se han relacionado con la fisiopatología de la ELA<sup>28</sup>.

En particular, se ha observado que la agregación de TDP43 en el citoplasma reduce la longitud del axón mediante la interacción de TDP43 con el citoesqueleto, mediante su unión a la proteína asociada a microtúbulos 1B o por alteraciones en el neurofilamento de cadena ligera a través de la interacción directa con su ARN.

Por otro lado, uno de los primeros eventos fisiopatológicos observados en las MNs es la interrupción del transporte de las mitocondrias por los axones. Se han identificado defectos en el transporte retrógrado y anterógrado en pacientes de ELA, que afecta a la renovación progresiva de las mitocondrias en los terminales axónicos. De esta manera, se produce una redistribución de las mitocondrias a lo largo del cuerpo celular, con un descenso en el número de mitocondrias en los axones y su organización formando agrupaciones<sup>28</sup>.

#### Cuadro 6. EL OLIGODENDROCITO EN LA ELA

Los oligodendrocitos son células gliales responsables de la mielinización de los axones en el SNC. Esta función es altamente importante, no solo porque se produce un aislamiento eléctrico del axón, aumentando la eficiencia de la transmisión nerviosa, sino que además juegan un papel fundamental como soporte trófico para las neuronas: son capaces de transformar glucosa en lactato o piruvato, y transportarlo a las neuronas en función de sus requerimientos energéticos. Este transporte se produce por los transportadores de monocarboxilato 1 y 2 (MCT1 y MCT2), en un proceso mediado por los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) de los oligodendrocitos. Se ha observado en casos de **ELA debida a mutaciones en SOD1**, una degeneración de los oligodendrocitos, previa al debut de la enfermedad. Más aún, existe un incremento en la proliferación de este tipo celular, que no llega a su estado madurativo. Además, los oligodendrocitos con la presencia de la mutación SOD1<sup>G93A</sup> presentan una reducción en la expresión de receptores MCT1. Estudios en médula espinal mostraron que la reducción en la síntesis de SOD1<sup>G93A</sup> en oligodendrocitos retrasaba el inicio de la enfermedad. Curiosamente, la reducción de mSOD1 no siempre resulta beneficiosa y depende del estado madurativo de estas células. De esta forma, mientras que una reducción de mSOD1 en precursores de oligodendrocitos (OPC) resulta positiva para el retraso del inicio de la enfermedad. Esto mismo no sucede si se produce en el oligodendrocito maduro<sup>85</sup>.

También se le ha atribuido a los oligodendrocitos la capacidad de afectar directamente a la viabilidad de las MNs por un efecto de muerte celular no autónoma<sup>665</sup>. En los casos de **ELA mediada por TDP43**, se han identificado inclusiones de esta proteína<sup>666</sup>, en este caso viéndose comprometida como consecuencia la capacidad autofagocítica de las células<sup>85</sup>. En el caso de los oligodendrocitos, la proteína TDP43 parece tener un papel relevante en la función del oligodendrocito maduro, ya que la depleción de esta proteína produce necroptosis en estas células, aunque este defecto no es suficiente para producir un efecto celular no autónomo y afectar a las MNs.

#### Alteraciones musculares

Además del deterioro en el SNC, la ELA cursa con alteraciones a nivel periférico, y la degeneración del tejido muscular en biopsias de pacientes aparece de manera recurrente. Además de los defectos morfológicos, una de las alteraciones más graves de la mayoría de esta y otras enfermedades neuromusculares es la pérdida de la conexión entre el músculo y el nervio, lo que provoca una falta de comunicación efectiva entre ambos sistemas. Esto produce la debilidad muscular característica de estas enfermedades. En **modelos animales** basados en la proteína **mSOD1**, se observan alteraciones funcionales en el músculo, y aparece la degeneración temprana de la unión neuromuscular (UNM), especialmente en su elemento postsináptico, de manera previa a las alteraciones en la MN<sup>44,108,109</sup>.

Durante el desarrollo, MN y fibra muscular mantienen una comunicación estrecha y constante, necesaria para el correcto establecimiento de la conexión sináptica. A pesar de que inicialmente se le atribuía al músculo un papel pasivo en este proceso, diversos trabajos han demostrado su importancia en el establecimiento de esta conexión. Concretamente, se ha descubierto que el patrón expresión de los receptores de acetilcolina en la fibra muscular está preestablecido, y el papel de la MN es el de refinar su localización a zonas más específicas, contribuyendo a la maduración de esta sinapsis<sup>110,111</sup>.

Durante años, se atribuían todas las consecuencias a la expresión de mSOD1 en las MNs. Sin embargo, se ha visto que promover la supervivencia de la MNs, mediante la inhibición de las vías de muerte por apoptosis, solo presenta un retraso parcial de la denervación muscular, y en muchos casos no mejora el fenotipo motor de los animales. Por otro lado, se han hecho estudios sobre modelos experimentales en los que la expresión de mSOD1 es exclusiva del músculo, lo que producía un incremento en el EO de manera local y esto provocaba la atrofia muscular. Además, la mutación de SOD1 exclusiva en músculo era capaz de producir degeneración de la UNM y muerte de la MNs, provocando en estos animales un fenotipo completo de ELA<sup>44,112</sup>. Asimismo, los ratones mSOD1 presentan un descenso en los niveles de ATP celular y disfunción

mitocondrial, debido al incremento de proteínas de desacoplamiento mitocondrial. Estos defectos, sumado al déficit energético crónico que presentan estos animales, debido a una la tasa metabólica exacerbada (especialmente en el metabolismo lipídico y consumo de glucosa por parte de los músculos), son capaces de provocar la degeneración de la UNM<sup>113</sup>. En este sentido, podemos decir que el músculo esquelético juega un papel relevante en el desarrollo de la ELA, ya sea a través de un aumento en su tasa metabólica, precipitando defectos sistémicos en la homeostasis energética, o influyendo directamente en la estabilidad de la UNM, a través de defectos en el metabolismo energético y otras vías de señalización<sup>114,115</sup>.

Recientemente, se ha descubierto que los defectos en la contractibilidad muscular preceden a las alteraciones en la conectividad, que a su vez es previa a la atrofia muscular. En un estudio en ratones con la mSOD1, se ha visto que previo al inicio del fenotipo motor, que ocurre en torno a los 90 días de edad de los animales, existe una pérdida de la contractibilidad muscular, ya a los 40 días de edad, y un defecto en la conectividad entorno a los 70 días. Por lo tanto, en este modelo animal se produce un desacoplamiento en la excitación – contracción previa al fallo en la transmisión neuromuscular, lo que produce una reducción temprana de la contractibilidad. Este estudio relaciona estos defectos en la funcionalidad muscular con el incremento del EO observado en el sarcolema y retículo sarcoplasmático de estos animales, mediante anomalías en la regulación del calcio, la función del miofilamento o la producción de ATP<sup>109</sup>.

Parece, por lo tanto, que el papel que juega el músculo esquelético en la ELA no es solo una consecuencia del daño generalizado, pudiendo tener un papel causal en la degeneración neuronal.

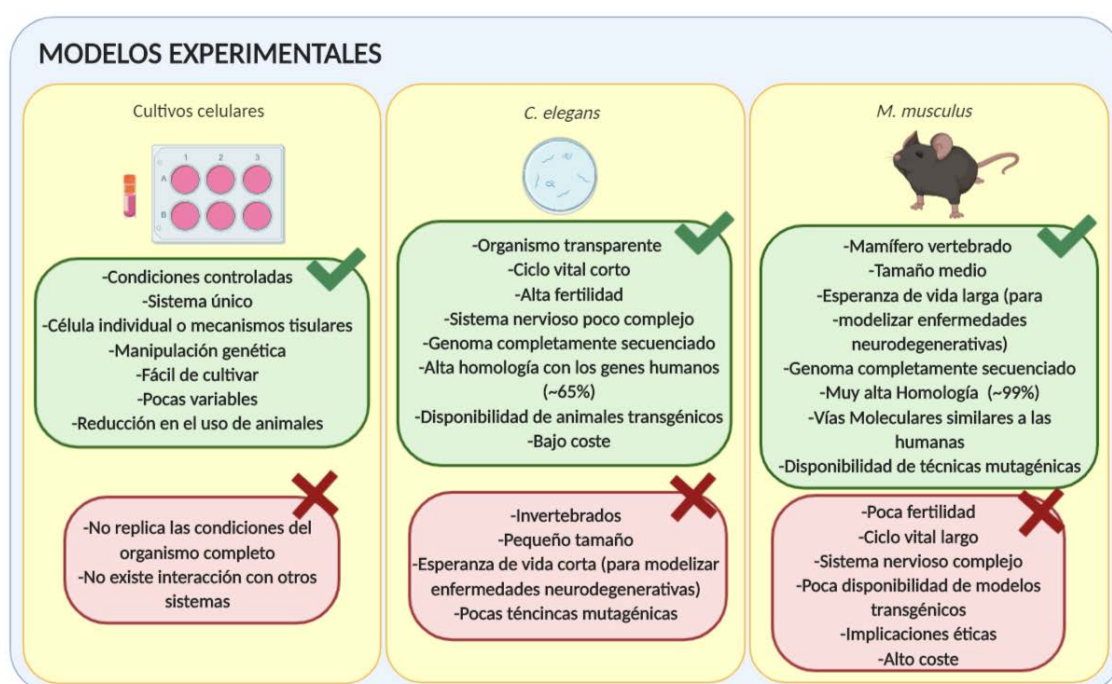
### Modelización de la enfermedad

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa muy compleja y heterogénea, caracterizada por la contribución de un gran número de alteraciones y variaciones genéticas, que, de manera individual o colectiva, contribuyen o causan la enfermedad. Esta particularidad hace que sea especialmente difícil diseñar estudios epidemiológicos para establecer las claves de aparición de la enfermedad y su etiología<sup>26</sup>. El descubrimiento de los genes implicados en la patología ha supuesto un avance muy importante en el estudio e identificación de las vías patogénicas de la ELA y ha contribuido a la creencia de que la ELA, lejos de ser una enfermedad inexplicable y multicausal, consiste en un grupo de condiciones patológicas que contribuyen de manera coordinada en la degeneración de las MNs, y en muchos casos, en la patología convergente de TDP43<sup>32</sup>.

Sin embargo, por otro lado, el hecho de que existan tantas alteraciones genéticas, en genes de tan diversa implicación funcional, y que todas ellas sean capaces de producir el mismo conjunto de eventos fisiopatológicos, se presenta como una oportunidad muy útil a la hora de modelizar esta enfermedad. Existen numerosas aproximaciones experimentales para el estudio de la ELA (**Figura 6**). Por un lado, se utilizan aproximaciones *in vitro*, mediante el uso de **sistemas celulares**, para el estudio detallado de diferentes eventos patológicos que ocurren en la enfermedad. Por ejemplo, se han utilizado sistemas celulares en estudios de oligomerización y agregación proteica, que han contribuido al entendimiento de los principios biofísicos por los cuales ciertas proteínas tienden a plegarse mal y agregarse en la ELA.<sup>116</sup> También se ha

desarrollados estudios en cultivos primarios de MNs de rata que han sido útiles para corroborar el papel del astrocito en la susceptibilidad de la MNs a la excitotoxicidad mediada por glutamato<sup>73</sup>.

Con el descubrimiento del primer gen implicado en la ELA, y gracias a los avances en ingeniería genética, se han elaborado numerosos **modelos animales** como herramienta para estudiar la fisiopatología de la ELA, ya que son capaces de mimetizar parte de la sintomatología y de las disfunciones orgánicas encontradas en la ELA<sup>26,32</sup>. Esto nos permite hacer una aproximación, quizá más simplificada, pero de enorme utilidad. No podemos obviar, por otro lado, que este tipo de modelos tiene ciertas limitaciones, ya que el contexto genético en el que se basa la enfermedad es esencial para su estudio. Por lo tanto, la posibilidad de trabajar con modelos animales resulta muy útil a la hora de desgranar la patología, y



**Figura 6. Diferentes modelos experimentales que se utilizan en la investigación de la ELA. Adaptado de Gois et al. 2020**

establecer el papel que tienen los diferentes genes y poder relacionar las alteraciones genéticas con los diferentes eventos fisiopatológicos característicos de la ELA, pero nunca sin perder de vista que son aproximaciones parciales a lo que en realidad está sucediendo en la enfermedad.

A pesar de que los modelos experimentales desarrollados en roedores son los más utilizados para el estudio de END, y son considerados como herramienta preclínica estrella en el estudio de terapias farmacológicas, existen modelos de ELA basados en organismos más sencillos. Estos modelos tienen la ventaja de ser más rápidos de generar, fáciles de mantener, y es relativamente fácil establecer una relación entre las diferentes alteraciones genéticas que provocan la neurodegeneración, ya que se pueden estudiar los efectos que producen estas mutaciones el organismo en su conjunto<sup>116</sup>. Así, encontramos numerosos trabajos que utilizan el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como modelo de proteinopatía basada en TDP43<sup>117–119</sup>, así como en *D. melanogaster* (Mosca de la fruta) o *D. rerio* (pez cebra)<sup>116,120–124</sup>. Sin embargo, la mayoría de los modelos animales están desarrollados en mamíferos, generalmente roedores, ya que se utilizan para estudiar el desarrollo de la patología en un sistema lo más parecido posible al del ser humano<sup>32</sup>.



Por otro lado, en ocasiones surgen herramientas de trabajo que presentan una oportunidad dual. Este es el caso de los perros con mielopatía degenerativa canina, una enfermedad canina espontánea, de origen genético, que comparte sintomatología y características patológicas con la ELA. En estos animales, el papel de la investigación es doble: por un lado, cualquier avance implica directamente un beneficio a favor de los animales que padecen la enfermedad, y por otro, sus similitudes con la ELA la convierte una oportunidad única de trabajar con una variante de enfermedad espontánea similar a la ELA, que nos sirve como modelo experimental muy poco usual<sup>125–128</sup>. Además, esto nos permite trabajar con un organismo de mayor complejidad y con mayor similitud genética con el ser humano<sup>129–131</sup>.

### Modelos murinos basados en el gen SOD1

Debido a que SOD1 fue el primer gen relacionado directamente con la ELA, el modelo de SOD1 fue el primero modelo animal en validarse, y actualmente sigue siendo el modelo más utilizado<sup>32</sup>. Existe una gran variedad de mutaciones en SOD1 que han sido utilizadas para generar modelos animales: G37R, D90A, G85R, etc<sup>26</sup>, y cada una de ellas presenta características particulares, ya sea por el debut de la enfermedad, su severidad, o variaciones en la progresión de la enfermedad asociadas al sexo<sup>132</sup>. Los estudios llevados a cabo en modelos de SOD1 nos han permitido estudiar los mecanismos que se esconden detrás de los diferentes eventos fisiopatológicos tan característicos de esta enfermedad neurodegenerativa, como, por ejemplo, la toxicidad por glutamato, alteraciones en el transporte axonal, EO, anomalías en las mitocondrias o defectos en el plegamiento de las proteínas. Además, gracias a este modelo, se pudo identificar la implicación de la microglía y los astrocitos en la patología de la ELA<sup>26,32</sup>.

### Modelos murinos basados en el gen TARDBP

El descubrimiento de TDP43 como marcador patológico de la ELA supuso la aparición de más de 20 modelos murinos basados en esta proteína. Para la elaboración de estos modelos se utilizaron dos aproximaciones principales. Por un lado, debido a que los pacientes de ELA presentan un incremento en la expresión de TDP43 de 1.5 a 2.5 veces, la primera aproximación fue generar un modelo experimental murino que sobreexpresase esta proteína en rangos similares, pero lamentablemente, estos animales no desarrollaban un fenotipo de tipo ELA<sup>36</sup>. Por otro lado, esta vez con mayor éxito, se desarrollaron modelos con la **sobreexpresión de mutaciones de la proteína humana TDP43**. Existen diferentes modelos basados en las principales mutaciones encontradas en los pacientes. La mayoría se basa en las mutaciones M337V y A315T. En ambos casos, los modelos presentan una aparición temprana de la sintomatología de tipo ELA, con fenotipo motor severo, agregados proteicos ubiquitinizados y anomalías morfológicas en las MNs<sup>32</sup>. En ambos casos, existe una correlación entre los niveles de expresión de la proteína TDP43 mutada y la severidad del modelo<sup>32</sup>. En los modelos con baja expresión de proteína, aparece una disfunción motora con asociada al envejecimiento de estos animales, con acumulaciones citosólicas de TDP43, pero el animal no llega a mostrar disfunciones motoras severas<sup>36</sup>. Sin embargo, modelos con alta expresión proteica presentan un inicio de los síntomas muy temprano, progresión rápida de la enfermedad y sin la presencia de inclusiones citosólicas neuronales<sup>36</sup>.

## Modelos murinos basados en otras mutaciones

Existen casi una docena de modelos murinos basados en diferentes mutaciones del gen *fus*, basadas en pérdidas de función o en la sobreexpresión de la proteína FUS mutada. Los modelos basados en la hipótesis de pérdida de función en ocasiones son letales en etapas perinatales, o bien no presentan características típicas de la ELA, lo que parece indicar que el papel de FUS en la ELA lejos de ser debido a una pérdida de función, puede ser debido a una ganancia de función tóxica<sup>32</sup>. Por otro lado, recientemente se están desarrollando modelos basados en la expansión en el gen C9orf72. Estos modelos presentan similitudes con la neuroinflamación típica que encontramos en la ELA. Por último, también se han desarrollado modelos de los genes con carácter minoritario en la ELA, como son PNF1, UBQLN2, OPTN, etc.<sup>32,36</sup>.

## CANNABINOIDES: UN VIAJE DESDE ORIENTE HASTA EL DESCUBRIMIENTO DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Las propiedades medicinales del cannabis han sido exploradas de manera recurrente a lo largo de la historia (**Figura 7**). Estudios paleobotánicos sitúan al género *Cannabis* en el Holoceno. La primera evidencia de su uso aparece hace 10.000 años, al final de la edad de hielo, en Japón<sup>133</sup>. Ya en los campamentos de los primeros nómadas del viejo mundo existen pruebas de la explotación del cultivo de cannabis por sus versatilidad como recurso<sup>134</sup>. En la antigua Mesopotamia, en el siglo XXIV EC, bajo el nombre *ganzi-gun-un* (“la droga que quita la mente”), aparecen registros del uso del cannabis por sus propiedades psicoactivas y medicinales. Desde entonces, la producción y consumo de cannabis en Oriente Medio ha sido constante gracias a su domesticación, en parte favorecida por su gran adaptabilidad al clima. En China e India, el cannabis también era utilizado por la naturaleza dual de sus efectos, tanto psicoactivos como medicinales, y lo utilizaban para el tratamiento de diferentes afecciones. En la Medicina indígena fue muy popular, especialmente en la India, utilizado como espasmolítico, hipnótico y analgésico y para aumentar la resistencia del cuerpo al estrés físico grave<sup>135</sup>. Su entrada en la Medicina Europea vino de la mano de la delegación científica que acompañaba a las tropas napoleónicas en su retorno desde Egipto<sup>136</sup>. Los preparados de cannabis se utilizaron en Europa en determinadas condiciones mentales, y además por sus propiedades analgésicas y sedantes.

Curiosamente, a lo largo de la historia se ha descrito en numerosas ocasiones el carácter psicoactivo del cannabis y sus derivados, y sin embargo la investigación para identificar su mecanismo de acción en el cerebro ha sido mucho más lenta. Una de las posibles explicaciones es el hecho de que, hasta los años 40, no se aisló el primer componente de la planta *cannabis sativa*, el cannabinal (CBN)<sup>135</sup>, y hasta los años 60 no fue identificada la estructura química de los dos principales constituyentes del cannabis, el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) y en cannabidiol (CBD)<sup>137</sup>, abriendo la puerta a la posibilidad de sintetizarlos en el laboratorio. Una vez el  $\Delta^9$ -THC estuvo disponible para la investigación, aparecieron cientos de trabajos sobre sus características farmacológicas y su acción fisiológica. Además, el conocimiento de la estructura del  $\Delta^9$ -THC permitió el diseño y la síntesis de análogos estructurales que se convirtieron en herramientas de gran utilidad para el estudio farmacológico de los cannabinoides. De esta forma, a mediados de los años 80 ya se disponía de bastante información de la farmacología de los compuestos derivados de las plantas del cannabis, pero aún se desconocía el mecanismo de a través del cual se producían sus efectos<sup>136</sup>.

Inicialmente se les atribuyó a estos derivados de la planta *C. sativa*, denominados fitocannabinoides, un mecanismo de acción no específico, basado en la modulación de las propiedades de las membranas celulares. Sin embargo, investigaciones posteriores basadas en las características estereoespecíficas de ciertos compuestos cannabinoides de origen sintético, hicieron que esta idea acerca de un mecanismo de acción independiente de receptor se volviera poco plausible, dando paso a la idea de que debía existir un mecanismo de acción mucho más específico. Así, en los años 80, Devane y colaboradores<sup>138</sup> demostraron la capacidad de unión de los ligandos cannabinoides a receptores celulares específicos localizados en el membranas de células neurales de rata. Este descubrimiento fue realizado con la ayuda de un ligando cannabinoide sintético, el CP-55,940, que gracias a su mayor solubilidad acuosa con respecto a los fitocannabinoides permitió realizar estudios clásicos de interacción ligando-receptor. Estos resultados fueron posteriormente confirmado por otros investigadores<sup>139</sup>. Esto supuso la confirmación de que los efectos de estos derivados botánicos eran mediados por su unión a receptores celulares altamente expresados en SNC, de ahí sus característicos efectos psicoactivos, aunque también localizados en la periferia, inicialmente encontrados en sistema inmune<sup>140</sup>. Estos receptores fueron denominados receptor cannabinoide de tipo I (CB<sub>1</sub>)<sup>138,141</sup> y receptor cannabinoide de tipo 2 (CB<sub>2</sub>)<sup>142</sup>. El hecho de que existieran unos receptores específicos para estos compuestos exógenos sugirió la existencia ligandos endógenos, con actividad sobre estos receptores. De esta forma, se identificaron los denominados endocannabinoides (ECs), primero la *N*-araquidonoiletanolamina o anandamida (AEA)<sup>143</sup>, y posteriormente el 2-araquidonoilglicerol (2-AG)<sup>144</sup>. Con el transcurso de la investigación se han identificado más compuestos derivados de ácidos grasos de la familia de las etanolaminas y de los ésteres de glicerol con afinidad y actividad en los receptores cannabinoides<sup>145</sup>, aunque no han suscitado el mismo

interés en la investigación. A continuación, se identificó la maquinaria de degradación de los endocannabinoides. Por un lado, la AEA es hidrolizada mayoritariamente por la acción de una enzima amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), mientras que el 2-AG se degrada principalmente por la acción de una monoacilglicerol lipasa (MAGL)<sup>146,147</sup>. De esta forma, se fueron estableciendo las bases de lo que posteriormente se conocería como el sistema de señalización endocannabinoide o sistema cannabinoide endógeno (SEC).

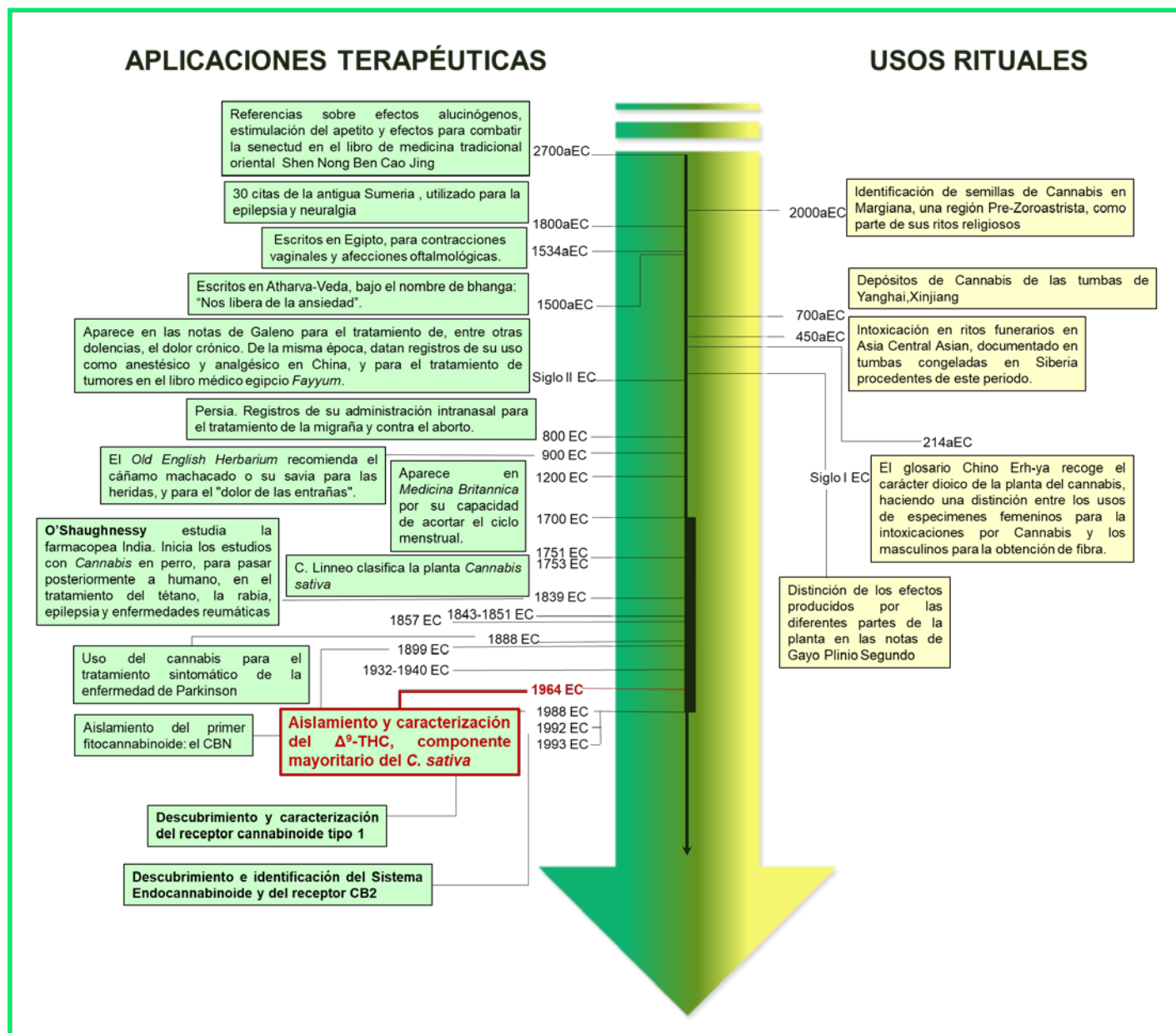
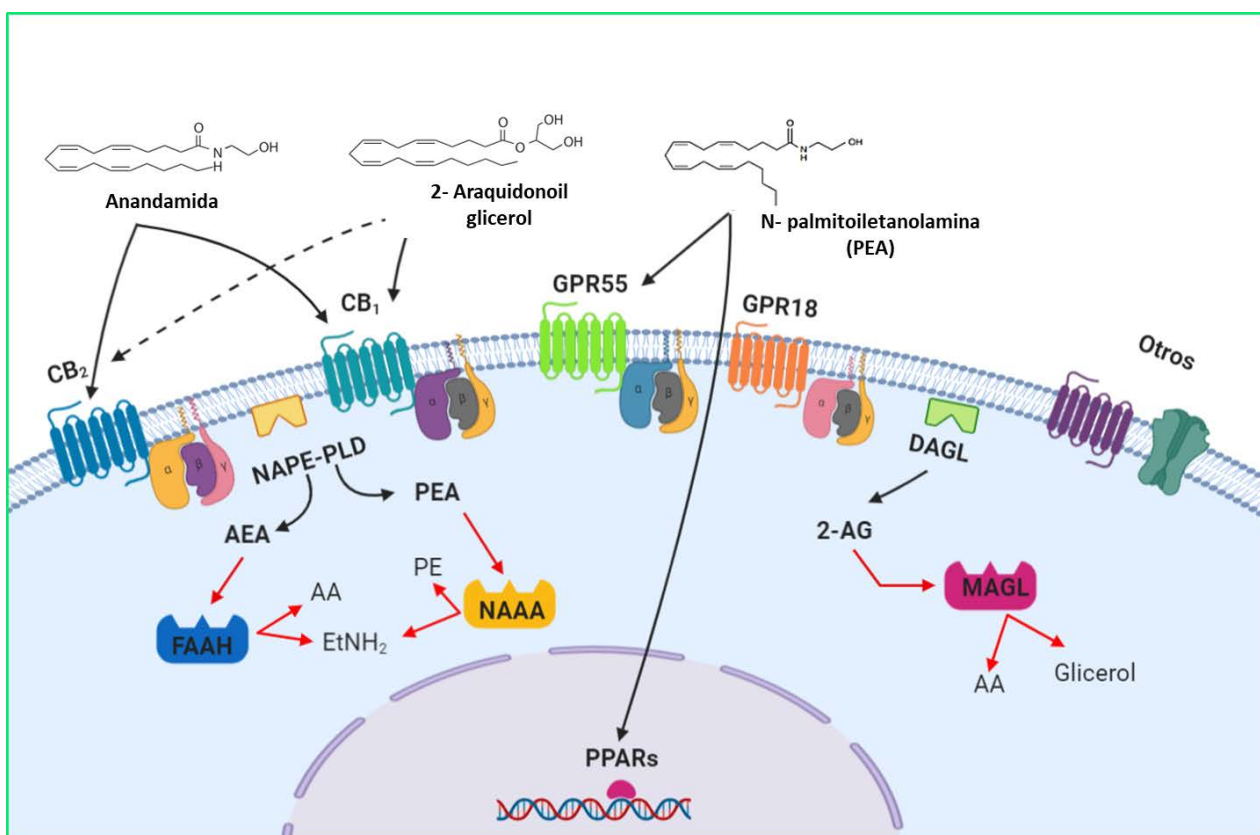


Figura 7. Esquema cronológico de algunos de los usos del cannabis a lo largo de la historia hasta el descubrimiento del Sistema Cannabinoide Endógeno. Adaptado de R.Pertwee 2014 y R.Mechoulam 2014

# Sistema Cannabinoide Endógeno

El SEC es un sistema modulador compuesto por receptores celulares, ligandos cannabinoides endógenos y la maquinaria enzimática responsable de la síntesis y degradación de estos (**Figura 8**). Además, debido su carácter lipofílico, estos ligandos requieren de la acción de ciertas proteínas citosólicas para ser transportados hacia sus dianas intracelulares, y probablemente para su recaptura y metabolismo.



**Figura 8. Esquema general del SEC. Principales vías de síntesis y degradación. Adaptado de Chiurchiu et al. 2015**

## Receptores celulares

Los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> fueron los primeros elementos del sistema en identificarse. Ambas proteínas presentan el 48% de homología en su secuencia de aminoácidos<sup>136</sup>, y alrededor del 68% en la secuencia de aminoácidos de los dominios transmembrana con respecto al receptor CB<sub>1</sub><sup>142</sup>. Estos dos receptores cannabinoides pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) heterotriméricas, con 7 dominios transmembrana, un extremo amino terminal extracelular y un extremo carboxilo terminal citosólico. Concretamente, los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> están acoplados

preferencialmente a proteínas  $G_{i/o}$  cuyo mecanismo de transducción de señal incluye la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK, de sus siglas en inglés), y la regulación de canales iónicos de calcio y potasio, además de otras vías de transducción<sup>148,149</sup>. Sin embargo, para facilitar una mayor diversidad de respuesta, los receptores acoplados a proteínas G adoptan diferentes conformaciones activas, en cada cual se asocian de manera preferente a diferentes cascadas señalizadoras, pudiendo por lo tanto asociarse a otras proteínas G en función del contexto celular<sup>150</sup>.

Por otro lado, se ha observado que estos receptores tienen la capacidad de asociarse con otros receptores y formar dímeros e incluso trímeros (**Cuadro 7**). De este modo, se han descrito asociaciones entre dos receptores iguales, lo que se conoce como homodímeros, o entre diferentes receptores, formando heterodímeros. Los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> pueden dimerizar y así modular mutuamente su activación<sup>151</sup>

### Receptor Cannabinoide de tipo 1 (CB<sub>1</sub>)

En humanos, el gen que codifica para esta proteína se localiza en cromosoma 6<sup>152</sup>. Se ha clonado a partir de tejido de rata, ratón y humano, presentando una similitud en la secuencia de aminoácidos entre las diferentes especies del 97-99%, lo que denota una conservación estructural a través de las diferentes especies<sup>153</sup>.

A pesar de que inicialmente se le atribuyó una localización exclusiva en el SNC, posteriormente se ha descrito la localización de este receptor en numerosos órganos periféricos. En el encéfalo, el receptor CB<sub>1</sub> es uno de los receptores acoplados a GPCRs más abundantes. Se localiza principalmente en ganglios basales (*sustancia nigra*, globo pálido), cerebelo e hipocampo y en menor medida, en corteza cerebral<sup>136</sup>. Además, aunque de forma menos abundante, se ha identificado la presencia de este receptor en áreas del sistema límbico (núcleo accumbens, área tegmental ventral y amígdala)<sup>139</sup>. La abundante presencia de este receptor en regiones sensoriales y motoras está en consonancia con su papel en la regulación de la motivación y la cognición y su papel en el control del movimiento. Además, es importante su presencia en áreas nociceptoras (como la sustancia gris periacueductal, tálamo y médula espinal) aunque localizado en núcleos muy concretos. A nivel periférico se ha descrito su localización en pulmón, sistema nervioso entérico, hígado, páncreas, bazo y células linfáticas y endotelio vascular, entre otros órganos, donde ejerce también un importante papel modulador<sup>154-157</sup>.

Uno de los primeros mecanismos de acción que se le atribuyeron al receptor CB<sub>1</sub> fue la inhibición de la enzima AC y las vías de transducción dependientes de adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Además, está implicado en la regulación del calcio intracelular mediante la inhibición de canales de calcio regulados por voltaje tipo N ( $I_{Ca}$ ). Además de estas funciones, se atribuye a la activación del receptor CB<sub>1</sub> la regulación de la actividad de la MAPK<sup>158-160</sup>. Todas estas acciones tienen gran relevancia en la homeostasis y control de la actividad neuronal actuando en la plasticidad sináptica, en la regulación de la liberación de NT, la migración celular y probablemente el crecimiento neuronal.

En las neuronas del sistema nervioso, tanto a nivel central como en la periferia, el receptor CB<sub>1</sub> se expresa fundamentalmente en los terminales presinápticos inhibiendo la liberación de NT mediante un mecanismo denominado señalización retrógrada. Por lo tanto, produce la inhibición de la neurotransmisión glutamatérgica, GABAérgica, glicinérgica, colinérgica, noradrenérgica y serotoninérgica del SNC, y adrenérgica, colinérgica y de la señalización sensorial

en sistema nervioso periférico (SNP)<sup>161</sup>. Además de su importante función reguladora en las neuronas, dentro del sistema nervioso también encontramos al receptor CB<sub>1</sub> en las células de glía, como los astrocitos, donde participan en la regulación de la actividad entorno a la sinapsis<sup>162</sup>, jugando un papel esencial en la comunicación neurona-astrocito<sup>163,164</sup>. También se ha descrito la presencia de este receptor en oligodendrocitos y microglía<sup>165,166</sup>.

La localización subcelular de los receptores CB<sub>1</sub> es muy variable y está asociada a los mecanismos de acción que regula (Figura 9). Aunque generalmente están ubicados a nivel presináptico, participando en la señalización retrógrada, en ocasiones se localizan a nivel postsináptico, donde podrían tener un papel regulador de la excitabilidad dendrítica, encontrándose incluso en zonas alejadas de la sinapsis<sup>167</sup>. Recientemente, se ha identificado la presencia del receptor CB<sub>1</sub> en la membrana mitocondrial externa (mtCB<sub>1</sub>), lo que sugiere su papel modulador de la respiración celular, y en la homeostasis de calcio, regulando así procesos bioenergéticos. Diferentes estudios han demostrado que la activación aguda de mtCB<sub>1</sub> altera la generación de ATP mitocondrial y la transmisión sináptica, lo que tiene un efecto en la plasticidad neuronal<sup>162,168,169</sup>.

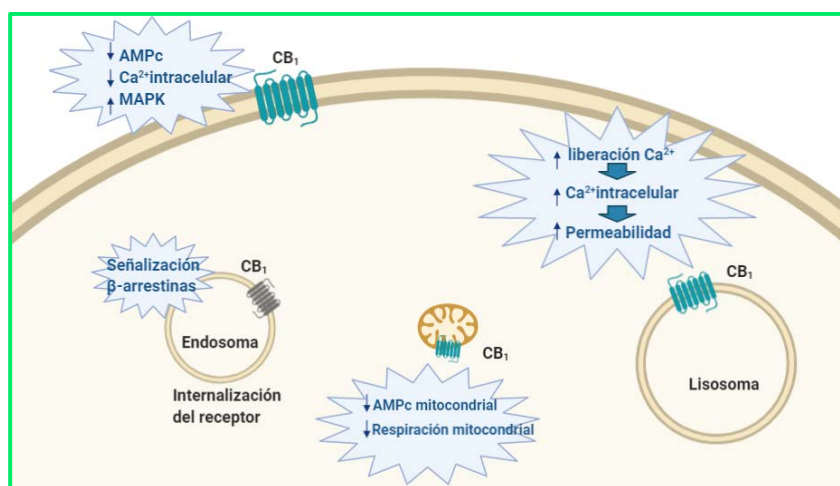
Algunos de los efectos fisiológicos derivados de la activación del receptor CB<sub>1</sub> son: efectos motores (por su presencia en ganglios basales y cerebelo), antieméticos (área postrema), analgésicos (Sustancia gris periacueductal, ciertos núcleos talámicos, médula espinal) y orexigénicos (hipotálamo anterior). Además, entre las principales acciones que se le atribuyen a este receptor se incluye la de ser el responsable de los

efectos psicoactivos del cannabis<sup>170</sup>. Esto se debe a que el  $\Delta^9$ -THC presenta cierta afinidad por el receptor CB<sub>1</sub>, provocando su activación en el SNC. A pesar de haberse demostrado el potencial terapéutico de la modulación de este receptor en condiciones patológicas<sup>171,172</sup>, los efectos secundarios no deseados que esto puede provocar a nivel emocional y motivacional ha condicionado el uso farmacológico del cannabis<sup>173</sup>.

### Receptor Cannabinoide de tipo 2 (CB<sub>2</sub>)

El receptor CB<sub>2</sub> es una proteína de 360 aminoácidos cuyo gen codificante se localiza en el cromosoma 1 en la posición 1p36.11<sup>174</sup>. A diferencia del receptor CB<sub>1</sub>, que está altamente conservado, CB<sub>2</sub> presenta una homología del 93% entre rata y ratón, y esta baja al 81% si comparamos el receptor CB<sub>2</sub> de rata con el de humano<sup>175</sup>.

La localización del receptor CB<sub>2</sub> en el organismo ha estado sujeta a mucha controversia, en especial en SNC, probablemente por su escasa presencia en condiciones fisiológicas, viéndose inducida su expresión bajo condiciones muy específicas.



**Figura 9. Localización subcelular del receptor CB<sub>1</sub> y principales vías de señalización en las que participa.** Adaptado de Zou 2018.

Asimismo, la dificultad de encontrar herramientas lo suficientemente sensibles y específicas para detectarlo ha entorpecido su identificación en los diferentes sustratos celulares<sup>176–178</sup>. Inicialmente se pensaba que la expresión del receptor CB<sub>2</sub> se restringía a la periferia, predominantemente localizado en células, tejidos y órganos relacionados con la respuesta inmunitaria. Así, donde primero se identificó el receptor CB<sub>2</sub> fue en bazo, seguido de amígdalas, linfocitos B y T y monocitos<sup>155</sup>. Posteriormente se describió su localización en órganos y tejidos no relacionados con el sistema inmune, como corazón, adipocitos, sistema nervioso entérico, endotelio pulmonar, células óseas, hepáticas y del páncreas<sup>179–183</sup>. A diferencia del receptor CB<sub>1</sub>, el receptor CB<sub>2</sub> tiene un patrón de expresión más limitado en el SNC, encontrándose principalmente en células que desempeñan un papel inmunológico, como es la glía<sup>184,185</sup>. Sin embargo, ciertos autores han postulado la posible presencia del receptor CB<sub>2</sub> en neuronas, basándose en los resultados de pruebas conductuales<sup>177,186–188</sup>. Por ejemplo, estudios en ratones con sobreexpresión de este receptor en SNC mostraban una reducción del dolor neuropático, son resistentes a los comportamientos de tipo depresivo y tienen disminución en la ansiedad. Estos resultados coinciden con posteriores análisis inmunohistoquímicos y de hibridación in situ en los que algunos estudios han descrito la presencia del receptor CB<sub>2</sub> en neuronas de diversa función<sup>177,189–192</sup>.

Gracias a las herramientas de secuenciación genómica, se ha identificado el gen *cnr2* que codifica para este receptor en chimpancé, vaca, pollo, ciertos anfibios y ciertas especies de peces. En humanos, rata, ratón y pez cebra, existen dos isoformas del gen que codifica para el receptor CB<sub>2</sub> con un patrón diferencial de expresión periférico o central<sup>193,194</sup>. De este modo, encontramos que la isoforma A se expresa predominantemente en caudado-putamen, amígdala, hipocampo, cerebelo, núcleo accumbens y corteza cerebral, con niveles similares a la periferia en músculo, bazo, intestino, leucocitos y riñón. En cambio, la isoforma B es prácticamente indetectable en SN y se encuentra predominantemente en bazo, y en menor medida en leucocitos, músculo, intestino, hígado y corazón. Ambas isoformas difieren en regiones no codificantes, y el resultado de su transcripción es la misma proteína<sup>195</sup>. Una de las diferencias más interesantes de estas isoformas es la región del promotor. La región promotora de la isoforma A tiene regiones de unión a factores de transcripción de respuesta a estrés, como la proteína 1 activadora o elemento de respuesta al estrés, que no tiene la isoforma B. Es probable por lo tanto, que el CB<sub>2</sub>A humano pueda dirigir la expresión de CB<sub>2</sub> a tejidos específicos y a neuronas o células gliales en respuesta a estresores fisiológicos<sup>193</sup>. Esta activación condicionada a estresores ambientales parece estar conservada, ya que en ratón de nuevo aparecen las regiones de unión para factores de transcripción de respuesta a estrés en el promotor de ambas isoformas<sup>193</sup>.

De manera similar al receptor CB<sub>1</sub>, la vía de señalización celular en la que participa este receptor implica su acoplamiento a las proteínas G<sub>i/o</sub>, mediante la cual inhibe la vía de AC y por lo tanto la acumulación de AMPc. Además, el receptor CB<sub>2</sub> también regula la actividad de las MAPK y modula la producción de ceramidas<sup>196</sup>. Recientemente se ha descrito la implicación del receptor CB<sub>2</sub> en la modulación de canales iónicos, efecto anteriormente atribuido exclusivamente al receptor CB<sub>1</sub><sup>149,197–199</sup>.

A diferencia del receptor CB<sub>1</sub>, la activación de este receptor no se asocia a los efectos psicoactivos de los cannabinoides, probablemente por su diferente localización en las estructuras clave del SNC. Este hecho, junto con la expresión tan diversa en diferentes órganos periféricos, ha hecho de este receptor una muy prometedora diana frente a diferentes patologías en las que su activación pueda resultar beneficiosa.



Existen numerosas investigaciones que relacionan la señalización mediada por el receptor CB<sub>2</sub> con procesos patológicos en enfermedades de diferente naturaleza, como inflamatorias, cardiovasculares, gastrointestinales, trastornos psiquiátricos, neurodegenerativas, etc.<sup>181,193,200–204</sup>. Además, en ciertas enfermedades, como es el caso de las neurodegenerativas, el patrón de expresión del receptor CB<sub>2</sub> se encuentra alterado<sup>185,205,206</sup>. Esto pone de manifiesto la importancia del este receptor en ciertas patologías, lo cual señala a este receptor como una diana terapéutica muy interesante para el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos.

#### Cuadro 7. OLIGOMERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES

Gracias al avance de la investigación se ha ido afianzando la idea de que las GPCR pueden existir como dímeros o multímeros. Esta asociación otorga nuevas propiedades farmacológicas a los receptores involucrados, como la aparición de nuevos sitios de unión o la preferencia de cascada de señalización e interacción con las proteínas G<sup>150,285,667</sup>. De este modo, la farmacología de los ligandos difiere en función de si actúa sobre un receptor individual, un homodímero o un heterodímero. Además, los ligandos selectivos de cada uno de los receptores pueden alterar la señalización de los receptores estabilizando una conformación respecto a otra y favoreciendo o no la asociación de receptores<sup>150</sup>. La primera asociación que se produce en estos receptores tiene lugar durante su proceso madurativo, y es esencial para producir GPCR funcionales<sup>285,667</sup>.

En términos generales, la formación de homodímeros es muy común en los GPCRs. Además, estos receptores pueden formar heterodímeros, ya sea con otros GPCRs de la misma familia o de diferente naturaleza, o con receptores ionotrópicos<sup>668</sup>. El sitio de dimerización no se encuentra localizado en una región concreta de la proteína, sino que se puede dar en dominios intracelulares, extracelulares o transmembrana<sup>285</sup>.

Mediante anticuerpos específicos se ha establecido la presencia de homodímeros del receptor CB<sub>1</sub> en SNC, con un patrón de expresión muy similar a los receptores marcados con anticuerpos no específicos de dímeros. Esto indica que este receptor se encuentra frecuentemente formando dímeros o multímeros. Por otro lado, se ha identificado la presencia del receptor CB<sub>1</sub> en la formación de complejos multiméricos con receptores de diversa índole, como el receptor de dopamina D<sub>2</sub>, siendo este uno de los más estudiados y probablemente el mejor descrito<sup>669–673</sup>. Además, en ciertos casos se forma un multímero CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>-A<sub>2A</sub> que forma una red molecular en la que este heterómero podría actuar como modulador de la neurotransmisión dopaminérgica estriatal, sumándole complejidad a la señalización<sup>674</sup>. También se han descrito heterómeros de CB<sub>1</sub> con el receptor de adenosina A<sub>2A</sub><sup>150,675</sup>, los receptores  $\mu$  opioide<sup>671,676,677</sup> o el receptor  $\beta$ 2 adrenérgico<sup>150</sup>. Por último, además de los anteriores, se ha observado la dimerización del receptor CB<sub>1</sub> con receptores de angiotensina AT<sub>1</sub><sup>678</sup>, orexina<sup>669,679–682</sup>, el receptor de serotonina 5HT<sub>2A</sub><sup>683</sup> y el receptor GPR55<sup>684</sup>.

En el caso del receptor CB<sub>2</sub>, la formación de heterómeros ha sido mucho menos estudiada. Uno de los heterómeros más estudiados es el formado por CB<sub>2</sub> y el receptor CXCR4, responsable de la migración, invasión y adhesión celular en procesos metastáticos<sup>685,686</sup>. Por otro lado, se ha identificado el heterómero CB<sub>2</sub>-HER2 en ciertos tipos de cáncer, así como el heterómero CB<sub>2</sub>-GPR55<sup>686</sup>. En estudios del heterómero CB<sub>2</sub>-GPR55 in vitro, se ha visto que la asociación con CB<sub>2</sub> produce una potenciación de la activación de las vías de señalización MAPK ERK1/2 del receptor GPR55<sup>687</sup>. Por último, se han identificado heterómeros del receptor CB<sub>2</sub> con el receptor de serotonina 5HT<sub>1A</sub>, sobre el que ejerce una función moduladora en ciertas patologías<sup>576</sup>.

Por último, es interesante señalar la existencia de heterómeros entre receptores cannabinoides CB<sub>1</sub>-CB<sub>2</sub> en ciertas áreas del SNC. La formación de estos heterómeros lleva a una regulación negativa entre agonistas y antagonistas, sugiriendo un nivel adicional de regulación de moléculas entre los dos receptores. Esta asociación parece tener un papel muy relevante durante los procesos de desarrollo<sup>151</sup>.

#### Otros receptores con actividad cannabinoide

La primera evidencia de la existencia de otros receptores con actividad cannabinoide deriva de los estudios del efecto vasodilatador de los endocannabinoides en el lecho arterial mesentérico<sup>175</sup>. Dichos efectos no se reproducían con el tratamiento con potentes cannabinoides sintéticos activadores de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, o fitocannabinoides como el  $\Delta^9$ -THC, lo que sugirió la activación de una vía independiente en la que no participaban los receptores cannabinoides

clásicos. Así, se postuló la existencia de un receptor cannabinoide endotelial. Posteriormente, mediante experimentos en ratones carentes del receptor CB<sub>1</sub>, se observó como el antagonista inverso selectivo de este receptor SR141617A era capaz de ejercer su efecto, lo que indicaba que estaba bloqueando otras vías independientes a este receptor<sup>207</sup>. Concretamente, se ha propuesto a GPR18 como un nuevo receptor cannabinoide endotelial<sup>208</sup>.

A nivel de SNC también se ha postulado la existencia de receptores cannabinoides atípicos, como por ejemplo varios receptores huérfanos acoplados a proteínas G. Estos receptores son **GPR18**, **GPR119** y **GPR55**. Estos receptores son activados por moléculas de señalización de naturaleza lipídica derivadas de ácidos grasos, entre los que se encuentran los propios endocannabinoides y moléculas relacionadas con su metabolismo<sup>209–211</sup>. Además, estos receptores cuentan con sus propios ligandos endógenos, como la araquidonoilglicina (AraG), N-araquidonoil serina (AraS), N-palmitoil etanolamida (PEA) y 2-AG para el GPR18, la oleoiletanolamida (OEA), la linoleoiletanolamida (LEA), la palmitoiletanolamida (PEA) y la oleoil y palmitoil lisofosfatidilcolina en el caso de GPR119 y el lisofosfatidilinositol para el receptor GPR55<sup>208,209,212–216</sup>. Se ha propuesto al receptor GPR55 como el más cercano a ser el receptor cannabinoide de tipo 3, pero debido a su escasa homología estructural con los otros dos receptores (13.5% para CB<sub>1</sub> y un 14.4% para CB<sub>2</sub>), junto a sus diferencias en farmacología y señalización<sup>213</sup>, se ha puesto en duda esta clasificación<sup>217,218</sup>. Algunos estudios han sugerido que este receptor está acoplado a proteínas G<sub>α12/13</sub> (y probablemente G<sub>α/q</sub>) que activan GTPasa RhoA provocando la movilidad del calcio. Se ha descrito que varios ligandos cannabinoides podrían activar este receptor<sup>208,210,211</sup>. Por otro lado, la AraS parece actuar sobre GPR55 vía proteínas G<sub>αi/o</sub> regulando ERKs y la vía de Akt<sup>208</sup>.

Recientemente se han relacionado con el sistema endocannabinoide a otros receptores huérfanos acoplados a proteínas G que podrían incluirse en este apartado. Es el caso de los receptores GPR92 y GPR6. El receptor GPR92. El receptor GPR92 inicialmente se caracterizó por su afinidad al ácido lisofosfatídico, aunque posteriormente se ha visto que el AraG es un ligando mucho más potente activando vías de G<sub>αs</sub><sup>208</sup>. Por otra parte, recientemente se ha observado el efecto de agonismo inverso de ciertos cannabinoides sintéticos y fitocannabinoides, como el WIN55,212, CBD o CBDV sobre el receptor GPR6, un receptor implicado en la regulación de la señal dopaminérgica<sup>219,220</sup>.

De nuevo, gracias a los estudios en arterias basales de rata y cobaya, se pudo establecer una relación entre el efecto vasodilatador de los cannabinoides y los canales de potencial transitorio **TRPs**<sup>175</sup>. Los receptores TRPs son una superfamilia de canales iónicos con una enorme diversidad en los mecanismos de activación y selectividad, lo que les diferencia del resto de canales iónicos. Este grupo de proteínas desempeña una función crítica en la respuesta a estímulos sensoriales, así como en la capacidad de las células de detectar los cambios en su entorno local, como la información térmica y osmótica<sup>221</sup>. Estos receptores se subdividen en dos grupos en base a sus características topológicas. El grupo 1 se divide en 5 subfamilias: canal de potencial transitorio no mecanorreceptor (TRPN), canal de potencial transitorio canónico (TRPC), canal de potencial transitorio de melastina (TRPM), canal de potencial transitorio vanilloide (TRPV) y canal de potencial transitorio de anquirina (TRPA).

Los cannabinoides son capaces de activar tres de estas 5 subfamilias, los receptores **TRPV**, **TRPA** y los **TRPM**. Los receptores TRPV están involucrados en la transmisión nerviosa del dolor y los comportamientos de huida o evitación en los animales invertebrados frente a estímulos osmóticos, térmicos y quimiosensoriales<sup>222</sup>. Estos receptores son activados por ácidos

grasos poliinsaturados, como el ácido araquidónico. Concretamente, el canal TRPV1 es activado el endocannabinoide AEA. Este canal participa en la transmisión de dolor de estímulos nocivos derivados del calor o químicos, y su umbral de activación se ve disminuido con las variaciones de pH o en presencia de ciertas sustancias como alcohol, nicotina o citoquinas proinflamatorias<sup>221,223</sup>. Además, se han identificado diferentes cannabinoides derivados de la planta capaces de activar, en mayor o menor medida, los receptores TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4<sup>224-226</sup>. El receptor TRPA1 también es activado por el  $\Delta^9$ -THC y otros fitocannabinoides y está involucrado en la integración de estímulos térmicos. Además, cannabinoides derivados de la planta como el  $\Delta^9$ -THC o el cannabigerol (CBG) son capaces de actuar a través de los canales TRPM8<sup>226,227</sup>. Es tal la relevancia que ciertos autores le dan a la interacción entre este grupo de receptores y los cannabinoides, que ha llegado a ser considerados los receptores ionotrópicos del SEC<sup>228</sup>

Además de los receptores cannabinoides GPCR y los canales TRPs, existe otro grupo de receptores sensibles a la acción de los ligandos cannabinoides. Es el caso de los **receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR**, por sus siglas en inglés). Existen tres subfamilias de estos receptores: **PPAR $\alpha$** , **PPAR $\beta/\delta$**  y **PPAR $\gamma$** . Los tres subtipos de receptores nucleares participan en los procesos de transcripción de genes diana. De esta forma, están involucrados de manera relevante en el metabolismo lipídico, en la regulación de expresión hepática de enzimas peroxisomales, en la sensibilidad a la insulina, homeostasis de la glucosa e inflamación<sup>229,230</sup>. Los ligandos naturales de estos receptores incluyen ácidos grasos y derivados eicosanoides. El estudio de los efectos de los cannabinoides sobre estos receptores comenzó con el descubrimiento de que la OEA, un lípido agonista cannabinoide de baja potencia y estructuralmente relacionado con la AEA, era capaz de actuar vía activación de los receptores PPAR $\alpha$  en la regulación del metabolismo lipídico, e incluso regular la conducta alimenticia de las ratas<sup>231,232</sup>. Por otro lado, se ha identificado al  $\Delta^9$ -THC como activador, dosis dependiente, del receptor nuclear PPAR $\gamma$ , siendo responsable de la regulación de numerosas funciones fisiológicas como la estimulación de diferenciación de adipocitos y vasorelajación<sup>230</sup>. Se han desarrollado cannabinoides sintéticos análogos al  $\Delta^9$ -THC, pero sin sus efectos psicoactivos no deseados, como potenciales herramientas farmacológicas<sup>233</sup>.

El efecto de los cannabinoides sobre los receptores PPAR implica una serie de enzimas, proteínas y vías de señalización interconectadas. Para poder actuar en los factores de transcripción nuclear PPAR, los cannabinoides deben ser transportados al núcleo, lo que podría implicar la acción de transportadores intracelulares<sup>234</sup>. Los ligandos PPAR, al unirse, facilitan la conformación de heterodímeros entre estos y los receptores X retinoides (RXR), un receptor nuclear que es activado por ácido retinoico. La formación de este dímero provoca cambios estructurales en los receptores PPAR e induce su unión con las regiones PPRE que encontramos en numerosos genes inducibles por PPAR. Mediante la acción de ciertos co-activadores o co-represores, esta transcripción puede ser inducida o inhibida<sup>235</sup>. Uno de estos co-activadores pueden ser a su vez, los endocannabinoides, como la AEA, que activando directamente los RXR puede provocar la formación del heterodímero<sup>236</sup>. Por otro lado, los cannabinoides pueden ejercer una acción indirecta sobre esta familia de receptores mediante su papel de precursores de nuevos ligandos con actividad potencial sobre los receptores PPAR. Por ejemplo, mediante el metabolismo de endocannabinoides por parte de las enzimas COX-2 y lipooxigenasa (LOX) se producen derivados eicosanoides, por ejemplo prostamidas, que sí son activadores identificado de los receptores PPAR<sup>237</sup>.

Los receptores PPAR están ampliamente distribuidos por el organismo, en diversidad de tipos celulares. En cerebro se expresan tanto en neuronas como en células de glía<sup>238</sup>. Además de sobre estos receptores, los cannabinoides tiene la

capacidad de modular otros sistemas de neurotransmisión mediante su acción directa sobre los receptores, como es el caso del  $\Delta^9$ -THC o CBD actuando sobre el sistema serotoninérgico<sup>239,240</sup>.

## **Ligandos endógenos del sistema cannabinoide endógeno**

Como ya hemos comentado, tras el descubrimiento de los receptores cannabinoides se inició la búsqueda de un ligando endógeno capaz de activarlos o modular su actividad. Así, en 1992 se aisló el primer ligando endocannabinoide, la AEA<sup>143</sup>, y poco tiempo después se descubrió el segundo ligando principal de este sistema, el 2-AG<sup>144</sup>. Los endocannabinoides son compuestos lipídicos, derivados del metabolismo de fosfolípidos de membrana. Son derivados de un ácido graso poliinsaturado de cadena larga, que forma un enlace amida, éster o éter, con un grupo polar pequeño<sup>241</sup> (**Figura 10**).

### **Araquidonoiletanolamida o Anandamida**

La AEA, también llamada Anandamida, es un derivado del ácido araquidónico y la etanolamida. Fue aislado por el equipo del profesor Raphael Mechoulam en 1992 mediante diferentes técnicas cromatográficas a partir de tejidos de cerebro porcinos, y posteriormente se confirmó su papel como ligando de los receptores cannabinoides mediante ensayos de desplazamiento de un ligando radiactivo<sup>143,242</sup>. La palabra Anandamida procede de la conjunción de dos términos: el prefijo sánscrito “Ananda” hace referencia a los efectos psicoactivos que ejercen los cannabinoides en el cerebro, que provocan una sensación parecida a la felicidad, mientras que la terminación “amida”, que hace referencia a su estructura química.

Mediante ensayos de *vas deferens* en ratón, se comprobó que la AEA ejercía una actividad inhibitoria equivalente a la que presenta el  $\Delta^9$ -THC, es decir, presentaba una actividad cannabimimética<sup>143</sup>. Los niveles endógenos de AEA en correlacionan entre su localización y la distribución del receptor CB<sub>1</sub>. Así, encontramos niveles más elevados de AEA en hipocampo, estriado, cerebelo, áreas cerebrales con alta expresión del receptor CB<sub>1</sub>, y a nivel periférico en bazo, donde hay alta expresión del receptor CB<sub>2</sub><sup>243</sup>.

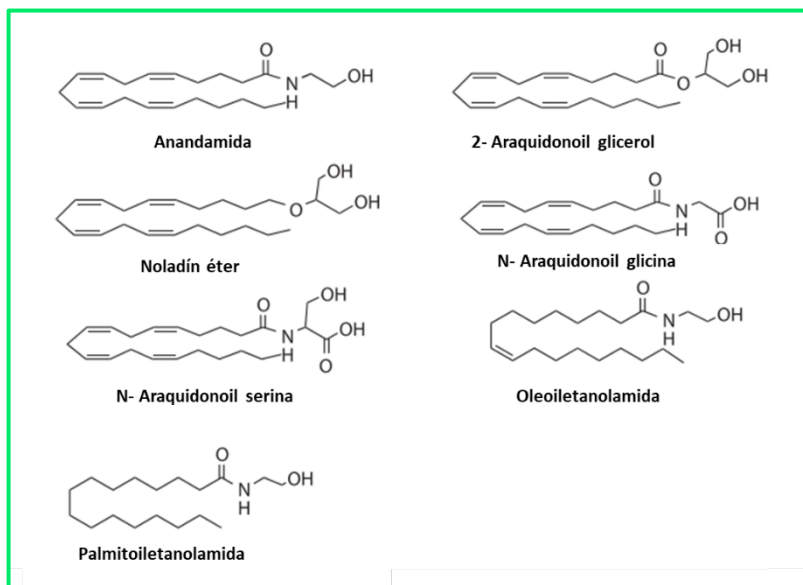
Este endocannabinoide es ligando tanto del receptor CB<sub>1</sub> como del CB<sub>2</sub>, sin embargo, la afinidad que presenta por cada uno de los receptores es diferente. En el caso de CB<sub>1</sub>, la AEA se comporta como una agonista parcial o completo dependiendo del tejido y el tipo de respuesta biológica analizada<sup>172</sup>. En cuanto a su actividad sobre el receptor CB<sub>2</sub>, la AEA es un agonista de mucha menos afinidad e incluso algunos autores la han catalogado como antagonista<sup>239,244</sup>. Además de los receptores cannabinoides clásicos, la AEA puede actuar a través del receptor TRPV<sub>1</sub><sup>245,246</sup>, GPR55<sup>247,248</sup> y los receptores PPAR<sup>230,234</sup>. Además, de manera independiente al SEC, la AEA puede ejercer actividad sobre los receptores de serotonina 5HT<sub>3</sub> y sobre el receptor de glutamato NMDA<sup>93,249</sup>.

### **2- Araquidonoil Glicerol**

A raíz del descubrimiento de la AEA, y debido a que este ligando no reproducía todos los efectos descritos por  $\Delta^9$ -THC en el organismo, motivó la investigación hasta que el propio Raphael Mechoulam aisló un segundo endocannabinoide, el 2-AG<sup>250</sup>. El 2-AG fue el primer ligando endocannabinoide aislado a nivel periférico<sup>144</sup>. Este endocannabinoide es un éster

formado entre el ácido araquidónico y el glicerol. Sus niveles basales en el cerebro superan aproximadamente en 1000 veces los de AEA, por lo que se le propone como el ligando principal del SEC<sup>250</sup>. Se ha encontrado a nivel central 2-AG en el tronco encefálico, estriado, hipocampo, médula y estructuras límbicas mayoritariamente<sup>249</sup>. Mientras que a nivel periférico se encuentra en intestino, bazo y páncreas, entre otros<sup>144</sup>.

El 2-AG se comporta como agonista completo de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, con mayor potencia y eficacia de unión en el caso de CB<sub>1</sub>, y sin embargo con un perfil de activación más potente en el caso de CB<sub>2</sub><sup>177,239</sup>. Además, ejerce sus efectos mediante la activación de los receptores TRPV<sub>1</sub> o GPR55<sup>213,245</sup>.



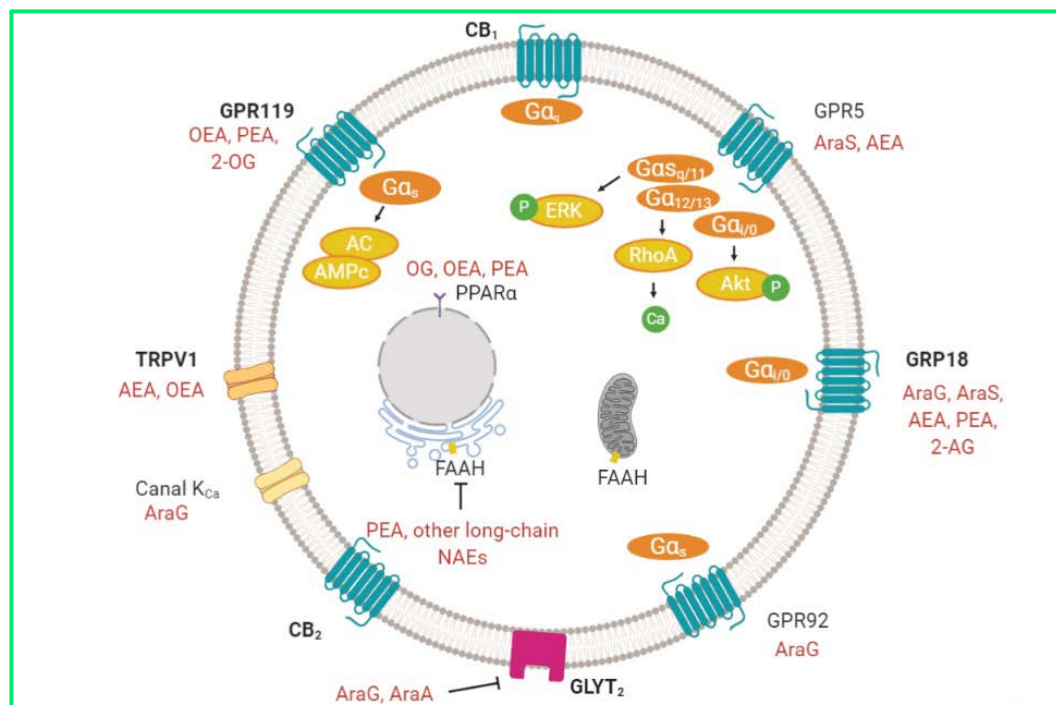
**Figura 10. Estructura química de los principales ligandos endógenos del SEC y otros ligandos con cierta actividad cannabinoide endógena. Adaptado de Pacher et al. 2020**

## Otros ligandos endógenos

A lo largo de los años se han ido identificando ligandos con actividad cannabimimética, ejercida con mayor o menor potencia, así como de forma tanto directa como, en ciertas ocasiones, indirecta. Estos ligandos son lípidos derivados de ácidos grasos. Así, se identificaron la Dihomo- $\gamma$ -linolenoiletanolamida y docosatetraenoiletanolamida, aislados en 1993 en cerebro de cerdo<sup>145</sup>. El mismo grupo de investigación logró aislar posteriormente el 2-araquidonilgliceril éter, también llamado Noladín éter, en cerebro de rata, mayoritariamente en tálamo e hipocampo. Además, en 2002, se identificó la *N*-araquidonoildopamina y posteriormente la Docosahexaenoiletanolamina y eicosapentanoiletanolamina. Estos dos últimos ligandos son derivados de los ácidos grasos omega 3, por lo que su concentración es altamente dependiente de la dieta<sup>93</sup>.

Entre los ligandos endógenos con actividad cannabimimética destacan tanto los productos del metabolismo de los endocannabinoides como la *N*-Araquidonoil Glicina (AraG), metabolito derivado tanto del metabolismo de la AEA, o la *N*-Araquidonoil Serina (AraS)<sup>208</sup>, como las *N*-aciletanolaminas (NAEs), como la PEA y la OEA, que son compuestos relacionados estructuralmente con la AEA. A pesar de su actividad cannabimimética, se ha visto que estos compuestos no se unen a los receptores cannabinoides clásicos<sup>251,252</sup>, por lo que su mecanismo de acción parece ser vía otros receptores, como los PPAR, TRP o receptores cannabinoides no canónicos (GPR55, GPR18, etc.) (**Figura 11**), o bien mediante efectos que

indirectamente aumenten el tono cannabinoide endógeno, por ejemplo, compitiendo por las enzimas de degradación de los endocannabinoides. Este efecto indirecto es conocido como “efecto séquito”<sup>208</sup>. De hecho, se considera “efecto séquito” a cualquier mejora notable que se produzca en la actividad de un endocannabinoide por la acción de otro componente endógeno, estructuralmente relacionado, que por sí mismo no tenga actividad definida<sup>136,253</sup>. De manera similar, existen monoacilglicerol de ácidos grasos diferentes al ácido araquidónico del 2-AG que presentan cierta actividad cannabinoide. Es el caso del 2-oleilglicerol (2-OG), que es capaz de activar los receptores GPR119<sup>254</sup>, y el 2-linoleoilglicerol, que puede actuar como agonista parcial del receptor CB<sub>1</sub>, entorpeciendo la unión con sus ligandos más activos y de este modo modulando su actividad<sup>255</sup>.



**Figura 11. Potenciales dianas farmacológicas de los ligandos endógenos relacionados estructuralmente con los endocannabinoides clásicos.** Los endocannabinoides y los compuestos similares a los endocannabinoides actúan sobre varios receptores además de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, incluidos los canales TRPV1, los canales de potasio dependientes de calcio (Canales K<sub>Ca</sub>), diferentes receptores de la familia GPR (GPR18, GPR55, GPR119, GPR92) y los receptores nucleares de PPARα. Entre las vías que señalizan se incluyen activación de las vías ERK, Akt y RhoA. *Adaptado de Pacher 2020.*

### Cuadro 8. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACOPLADAS A LOS RECEPTORES CANNABINOIDE

La mayoría de los efectos ejercidos por los ligandos cannabinoides son mediados por su interacción con los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Ambos receptores son GPCR que por su extremo C- terminal se acoplan preferentemente a proteínas G<sub>i/o</sub><sup>250</sup>. La señalización a través de estos receptores está controlada por los cambios en la conformación del receptor de inactivo a activo, lo que a su vez conduce a la activación de múltiples vías de señalización descendentes. Para facilitar una mayor diversidad de respuesta, estos receptores adoptan diferentes conformaciones activas, y cada una de estas se asocian preferentemente a diferentes cascadas de señalización<sup>150</sup>.

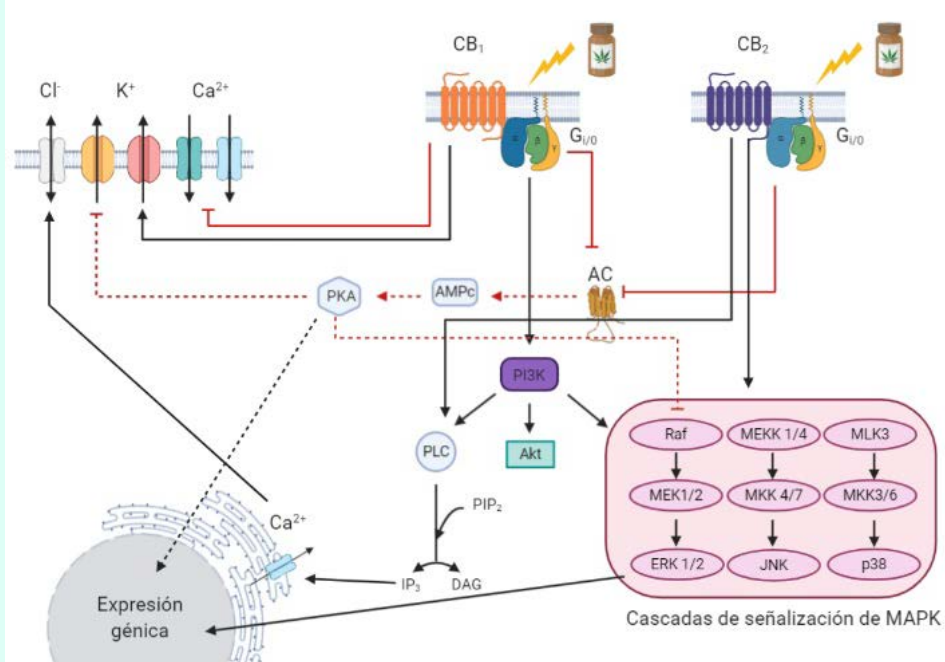
El estudio de estos efectos se ha dado en mayor profundidad para el caso del receptor CB<sub>1</sub>. Cuando se activa, una de las vías que inicia provoca la inhibición de la enzima AC y por tanto la formación de AMPc<sup>159,250</sup>. No obstante, bajo ciertas circunstancias, el receptor CB<sub>1</sub> puede actuar sobre otras proteínas G<sup>688</sup>. Por ejemplo, CB<sub>1</sub> es capaz de activar la AC al interactuar con proteínas G<sub>s</sub> con la consecuente producción de AMPc. Se ha observado este fenómeno en cultivo de neuronas estriales, cuando el receptor de dopamina D<sub>2</sub> y CB<sub>1</sub> son simultáneamente activados. También se ha visto este efecto en respuesta al agonista no selectivo WIN55,212-2, o cuando hay un bloqueo de las proteínas G<sub>i</sub> debido a PTX<sup>672,688-690</sup>. Asimismo, el receptor CB<sub>1</sub> de los astrocitos en el hipocampo está acoplado a G<sub>q/11</sub>, por lo que su activación desencadena un incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, disparando así la liberación de glutamato<sup>250</sup>.

Al mismo tiempo, el receptor CB<sub>1</sub> ejerce su papel modulador mediante su acción sobre ciertos canales iónicos. En el hipocampo, mediante el bloqueo los canales iónicos de calcio tipo N, regula la entrada de calcio y con esto la liberación del NT ácido γ-aminobutírico (GABA). Este efecto también se ha observado en los canales de calcio de tipo P/Q y R<sup>691-693</sup>. Además, CB<sub>1</sub> modula los canales de potasio acoplados a proteínas G (GIRK)<sup>694,695</sup>.

Bajo ciertas circunstancias específicas de sustrato celular y de ligando, los receptores CB<sub>1</sub> regulan las vías de las MAPK, que incluyen: las ERK1/2, JNK y p38. Estas proteínas están involucradas en la regulación de la proliferación y muerte celular y ejercen un control del ciclo celular<sup>689,696,697</sup>. Asimismo, CB<sub>1</sub> señala por la vía PI3K/Akt, también responsable de la regulación de las vías de crecimiento y muerte celular, ejerciendo efectos protectores en la supervivencia celular<sup>165,429,430,698</sup>.

De manera independiente a proteínas G, el receptor CB<sub>1</sub> también ejerce su papel regulador mediante su interacción con las β-arrestinas, que son mediadores clave en la desensibilización de las GPCRs. Una vez fosforilado un receptor por una quinasa específica para GPCRs (GRK), la β-arrestina se une e inicia el proceso de internalización. De hecho, la desensibilización del receptor CB<sub>1</sub> parece ser dependiente de la acción de la β-arrestina de tipo 2<sup>250</sup>.

En el caso de los receptores CB<sub>2</sub>, existen muchos menos datos acerca de los mecanismos de señalización acoplados a estos receptores. De manera similar al receptor CB<sub>1</sub>, este receptor presenta una interacción similar con la enzima AC, inhibiendo la producción de AMPc. Además el receptor CB<sub>2</sub> es capaz de señalar a través de la vía ERK<sup>552</sup> y de otras proteínas G, concretamente G<sub>s</sub><sup>699</sup>. Morgan y colaboradores identificaron el papel de ligandos selectivos del receptor CB<sub>2</sub> en la modulación de la transmisión nerviosa en corteza entorrinal. Posteriormente se le atribuyó a este receptor la activación de canales de cloro regulados por calcio en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal, lo que producía una reducción en la frecuencia de disparo de estas<sup>407</sup>.



Principales vías de señalización de los receptores cannabinoides. Adaptado de Bosier et al 2010.

Además, ciertos estudios funcionales

en cultivos primarios de neuronas han permitido atribuir a este receptor la capacidad de inhibir los canales de calcio dependientes de voltaje a nivel presináptico<sup>177</sup>, así como canales GIRK<sup>552</sup>. En conjunto, estos estudios permiten integrar a este receptor en el proceso convencional de señalización endocannabinoide. Sin embargo, hay que tener en mente que su papel en la señalización está determinado por su perfil altamente inducible<sup>177</sup>.

## Metabolismo de los ligandos endógenos

### **Biosíntesis de endocannabinoides**

Tanto la AEA como el 2-AG son principalmente sintetizados a demanda, en vez de encontrarse almacenados en vesículas, como ocurre con los NTs clásicos. Sin embargo, existen evidencias de su transporte, almacenamiento e incluso degradación en adiposomas<sup>256–258</sup>. Generalmente esta síntesis viene determinada en respuesta a un incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$ <sup>239</sup>.

A pesar de que tanto la AEA como el 2-AG son derivados del ácido araquidónico, sus rutas de síntesis y degradación son diferentes y están mediadas por enzimas diferentes. Así, la mayoría de la AEA sintetizada procede de la N-araquidonoil fosfatidil etanolamina (NAPE), mientras que el 2-AG procede de fosfoacilglicéridos que contienen 2- araquidonoil, principalmente del fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>)<sup>259</sup>. Es importante tener en cuenta que el 2-AG además de ser ligando endocannabinoide, participa también como metabolito intermedio en la biosíntesis lipídica y es reservorio de ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas<sup>259–261</sup>.

### Síntesis de la AEA

Se han establecido múltiples rutas de síntesis para la AEA, en función de las condiciones fisiológicas y patológicas en las que se encuentren las células. Además, estas vías de síntesis predominan de manera diferencial en las diferentes áreas cerebrales. De esta forma, se han establecido 4 rutas:

- La ruta llevada a cabo por la enzima fosfolipasa D específica de N-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD). Esta ruta es la mejor conocida ya que fue la primera en identificarse<sup>262</sup>. Mediante esta ruta, la AEA es generada de manera directa por su precursor de membrana, el NAPE, mediante la hidrólisis de este por parte de una fosfolipasa D, la NAPE-PLD<sup>263</sup>. La distribución celular de la NAPE-PLD solapa parcialmente con la localización del receptor CB<sub>1</sub><sup>259</sup>.
- La ruta de la NAPE-fosfolipasa C más la acción consecutiva de fosfatasa. Esta es la segunda ruta mejor estudiada. Se produce principalmente en el sistema inmune, pero también puede producirse en el cerebro<sup>259</sup>. En este caso, es la fosfolipasa NAPE-PLC la que produce la escisión de NAPE para dar como resultado un lípido, la fosfo-anandamida (pAEA), que requiere de la acción de una serie de fosfatasa, entre las que encontramos la proteína tirosin fosfatasa no receptor tipo 22 (PTPN22), que la desfosforilarán para dar la AEA. Esta ruta es la responsable exclusiva de la síntesis de AEA por parte de los macrófagos estimulados por la endotoxina LPS<sup>263</sup>. Además, se ha documentado en cerebro la presencia del intermediario de esta vía, la pAEA, lo que podría indicar que esta vía esté funcionando en otros tipos celulares además de en macrófagos<sup>263</sup>.
- Además, existen dos rutas alternativas. Por un lado, la doble desacilación de NAPE por parte de la alfa-beta hidrolasa de dominio 4 (ABHD4), seguida por una hidrólisis por la glicerol-fosfodiesterasa 1 (GDE1). En estudios in vitro, la enzima ABHD4 actúa como una fosfolipasa de tipo B selectiva para (liso)-NAPE y produce Glicerolfosfo-N-aciletanolamina (GP-NAE) a partir de NAPE. El GP-NAE resultante es un sustrato para la enzima dependiente de metales GDE1 (también conocida como MIR16)<sup>264</sup>. Por último, la AEA se puede sintetizar a partir de la hidrólisis



selectiva de un acilo, seguida de la acción de la liso-NAPE-PLD<sup>265</sup>. Tanto la tercera como la cuarta ruta de biosíntesis se han identificado en sistemas experimentales, pero su participación en la síntesis de AEA en SNC todavía no ha podido confirmarse.

### Síntesis del 2-AG

En el caso del 2-AG, la ruta de síntesis es mucho más sencilla que la de la AEA. La mayoría del 2-AG se produce mayoritariamente por la hidrólisis secuencial de PIP<sub>2</sub>, llevada a cabo por la fosfolipasa C beta (PLC $\beta$ ), seguido de la acción de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL), que hidroliza el diacilglicerol resultante. La primera parte de la vía está determinada por la activación de la PLC por parte de ciertos receptores, como por ejemplo los receptores metabotrópicos de glutamato (mGLUR), M1 y M3 muscarínicos o los receptores de orexina A<sup>239,259</sup>. Existen dos isoformas de la DAGL, la isoforma  $\alpha$  y la  $\beta$ . La isoforma  $\alpha$  parece ser la responsable de la mayor parte de la producción de 2-AG que contribuye a la plasticidad en la edad adulta del SNC. De hecho, estudios anatómicos colocan al receptor MGLUR5 cerca de la DAGL $\alpha$  en las espinas dendríticas, opuestos a los receptores CB<sub>1</sub> presinápticos<sup>266</sup>. Además, ciertos trabajos sugieren que la activación del receptor mGluR5 provoca la señalización retrógrada del 2-AG que, como consecuencia, suprime la sensibilidad al dolor<sup>239</sup>. Por otro lado, la DAGL $\beta$  también contribuye al 2-AG sináptico bajo ciertas condiciones fisiológicas, y participa de manera importante en la síntesis de este ligando durante la respuesta inmune<sup>259</sup>.

Otra vía de síntesis de 2-AG descrita es la resultante de la escisión del fosfatidil inositol por acción de la fosfolipasa A, seguida de la hidrólisis del producto resultante de la mano de la liso-fosfatasa C. Esta vía aparece de manera secundaria y por el momento, se desconoce su papel en el SNC<sup>259</sup>.

### **Finalización de la señal biológica**

#### **Degradación de los ligandos endocannabinoides**

El efecto producido por los endocannabinoides finaliza debido a su rápido catabolismo mediante hidrólisis, llevado a cabo principalmente por dos enzimas, la enzima FAAH, responsable principal de la degradación de la AEA (aunque en ciertas ocasiones está implicada en la degradación del 2-AG) y la MAGL, para la hidrólisis específica del 2-AG<sup>146,147</sup>. De manera alternativa, ambos endocannabinoides pueden oxidarse por la vía de la enzima COX-2, ciertas LOX o por la acción del citocromo P450. Sin embargo, estas rutas alternativas, lejos de servir como meras rutas catabólicas, están implicadas en la síntesis de nuevos lípidos de señalización, con un perfil muy diferente al de los endocannabinoides. Como ya se mencionó anteriormente, la degradación oxidativa de estos ligandos da como resultado nuevos productos biológicamente activos que ejercen su función sobre otras dianas diferentes a las de sus precursores<sup>239,267</sup>. En conjunto, las enzimas metabólicas de este sistema, tanto las de síntesis como las de degradación, son responsables de la biodisponibilidad in vivo de los endocannabinoides, lo que, como consecuencia, mantiene el tono cannabinoide endógeno<sup>267</sup>.

### Degradación de la AEA

La enzima FAAH es una proteína homodimérica de membrana de la familia de las serin hidrolasas. Ejerce su acción sobre una gran variedad de sustratos, incluyendo las NAEs, N-acilamidas y las N-aciltaurinas<sup>259,268</sup>. Esta enzima, identificada por Cravatt y colaboradores en 1996<sup>146</sup>, presenta una triada catalítica en la entrada del centro activo (compuesta por los aa serina241, serina217 y Lys142) esencial para que se produzca la hidrólisis<sup>228,269</sup>.

Posterior al descubrimiento de la FAAH se identificaron otras dos hidrolasas con actividad sobre la AEA: la isoforma 2 de la enzima FAAH (FAAH-2) y la cisteína hidrolasa lisosomal, la amida hidrolasa de ácido N-aciletanolamina (NAAA). La enzima FAAH-2 se ha encontrado en mamíferos no roedores<sup>269,270</sup>. Las enzimas FAAH (o FAAH-1) y FAAH-2 tienen una homología de secuencia del 20%, mientras que ninguna presenta homología con la NAAA, una glicoproteína con una secuencia homóloga a la ceramidasa ácida<sup>270,271</sup>.

Estas enzimas tienen una localización subcelular diferente. Por ejemplo, la FAAH-1 está ampliamente distribuida por el cerebro, y colocaliza a nivel presináptico con los receptores CB<sub>1</sub>. En el caso de FAAH-2, parece estar permanentemente localizada en tejido adiposo, asociada a los adiposomas, los cuales se postulan como posibles depósitos dinámicos de AEA<sup>256,270</sup>. La NAAA se localiza de manera preferencial el pulmón, donde se encuentra alojada en los lisosomas de los macrófagos<sup>269</sup>.

Por otro lado, ambas enzimas FAAH, a pesar de que actúan bajo condiciones fisiológicas óptimas similares, presentan diferente tasa de hidrólisis de sustrato. Además, también presentan diferente sensibilidad a inhibidores, siendo la FAAH-2 más sensible al inhibidor selectivo URB597. En cambio, la NAAA opera a un pH óptimo en torno a 5, y tiene preferencia por los NAEs monoinsaturados (PEA > myristoiletanolamida > estearoiletanolamida ≈ OEA > LEA > AEA)<sup>269</sup>. De hecho, se ha visto como la inhibición de la NAAA aumenta los niveles de PEA, incrementando la activación del receptor PPARα<sup>270</sup>.

A nivel farmacológico, es importante tener en cuenta que la selectividad de estas enzimas no es exclusiva de sustrato, por lo que la inhibición de FAAH o NAAA pueden elevar los niveles de otras amidas de ácidos grasos, provocando la activación de vías de señalización independientes de los receptores cannabinoides clásicos<sup>245,272</sup>. Además, a la hora de usar la inhibición de la FAAH como estrategia para aumentar el tono endocannabinoide, hay que tener en cuenta que esta puede provocar la activación de otras vías de degradación de AEA, como la vía de la NAAA, alterando otras funciones celulares.

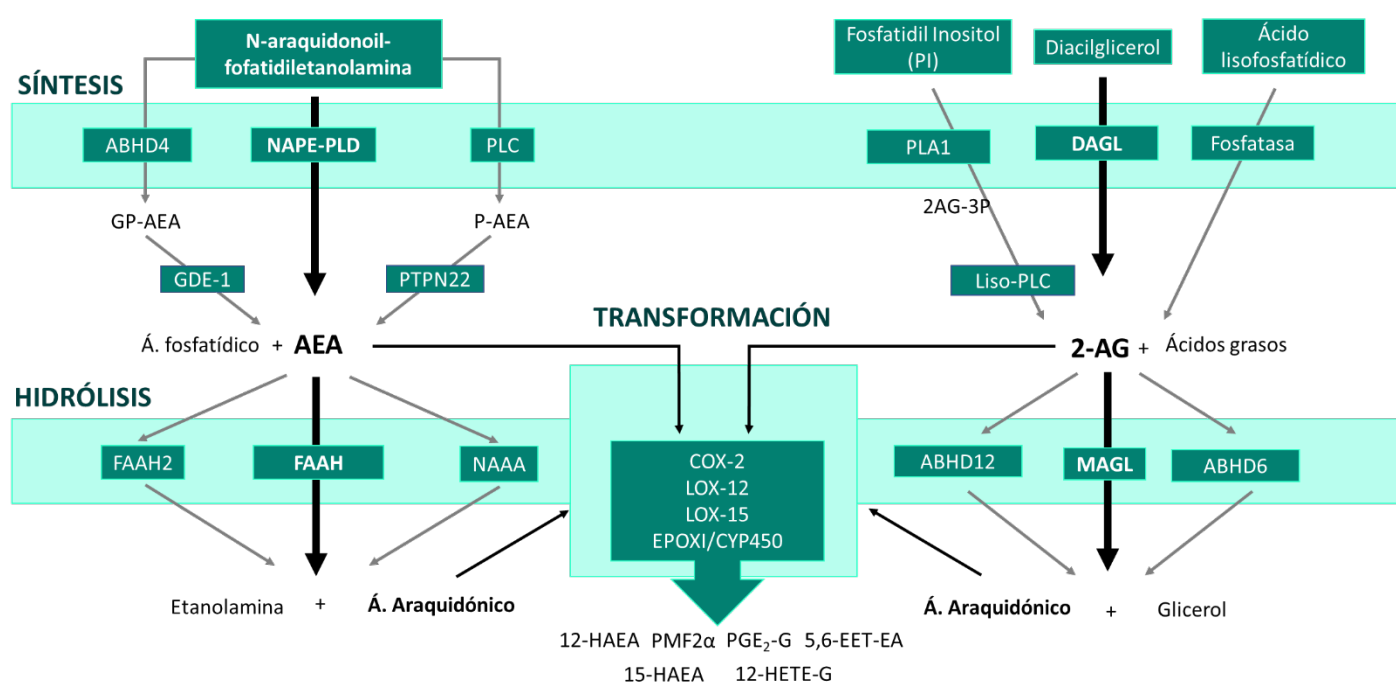
### Degradación del 2-AG

La enzima MAGL es la responsable de la degradación de alrededor del 85% del 2-AG. Esta enzima es más selectiva de sustrato en comparación con la FAAH-1, ya que su inhibición no altera los niveles de otros monoacilglicerol (como el monopalmitoilglicerol o el monooleoilglicerol). Esta enzima es una serina hidrolasa de 303 aa (≈30KDa) con una triada catabólica (serina122, aspartato239 e histidina269) altamente conservada en la filogenia<sup>269,270</sup>.

Además de esta enzima, existen otras hidrolasas con capacidad catalítica para el 2-AG y responsables de la degradación del 15% restante. Es el caso de la ABHD6 y la ABHD12<sup>273</sup>. Estas hidrolasas pertenecen a la familia de las α/β hidrolasas. La enzima ABHD6 es una serina hidrolasa de 337aa. Presenta cierta selectividad por los 1-acilglicerol frente a los 2-

acilglicerol<sup>269</sup>. La enzima ABHD12 es serina hidrolasa de 389aa con un dominio catalítico serina246, aspartato333 e histidina372.

Estas tres enzimas involucradas en la hidrólisis de 2-AG se distribuyen de manera diferente por el SNC, los que podría implicar que cada una de ellas, al menos parcialmente, tienen un papel fisiológico diferente en la regulación de la señalización mediada por 2-AG<sup>270,274</sup>. La MAGL se distribuye a lo largo de todo el SNC adulto en los terminales sinápticos. Su inhibición farmacológica produce el aumento de la señalización de 2-AG vía CB<sub>1</sub>, y además un descenso en la biodisponibilidad de ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas<sup>261</sup>. Por lo tanto, la inhibición de la MAGL altera procesos no relacionados con la señalización vía receptores cannabinoides, como son los procesos inflamatorios mediados por prostaglandinas. La ABHD6 se localiza principalmente en dendritas y espinas dendríticas de neuronas excitatorias de la corteza cerebral, por lo que su inhibición incrementa la actividad de las vías de señalización de 2-AG mediadas por CB<sub>1</sub> en SNC<sup>259</sup>. Además, se ha identificado a esta enzima fuera del SNC<sup>275</sup>. En ocasiones excepcionales el 2-AG puede ser hidrolizado por la enzima FAAH<sup>259</sup>.



**Figura 12. Principales vías de metabolismo de los endocannabinoides.** PTPN22: proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22; GP-AEA: Glicerolfosfo AEA; pAEA: Fosfo-AEA; 2AG-3P: 2-araquidonoilglicerol 3 fosfato; 12-HAEA: 12-hidroxi-AEA; 15-HAEA: 15-hidroxi-AEA; PMF2α: Prostaglandina F2α; PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>; 5,6-EET-EA: 5,6-epoxieicosatrienoil etanolamida; 12-HETE-G: 12-hidroxi-AG. *Adaptado de Fernández-Ruiz 2012.*

### Metabolismo oxidativo de los endocannabinoides

Como se ha comentado anteriormente, los endocannabinoides pueden ser sustratos de la acción de enzimas oxidativas de otras rutas, por ejemplo, las que participan en el metabolismo de eicosanoides, como las ciclooxigenasas (COX), lipooxigenasas (LOX) y enzimas del complejo citocromo P450, dando como resultado nuevos metabolitos con actividad biológica diferente a la de los endocannabinoides.

Por una parte, podemos hablar de **la ruta de la COX2**. Tanto la AEA como el 2-AG son metabolizados por la enzima COX2, pero debido a las características estereoquímicas del centro activo, no metabolizados por la enzima la COX-1<sup>269</sup>. COX-2 puede oxidar ambos endocannabinoides produciendo prostaglandina etanolamidas, también llamadas prostamidas (PG-EA) y prostaglandin glicerol ésteres (PG-GE)<sup>269,270</sup>. Ambos productos son metabolitos activos que ejercen su función sobre receptores no cannabinoides. Por ejemplo, en experimentos utilizando médula espinal de rata, se encontró que tras un estímulo inflamatorio se producía un incremento de la prostamida  $F_{2\alpha}$ , y esto provocaba proalgesia<sup>276</sup>, respuesta que, sin embargo, no era producida por la estimulación directa con prostaglandina  $F_{2\alpha}$ .<sup>269,270</sup> . Además, se ha visto que la prostaglandina D<sub>2</sub> glicerol éster reduce la activación de macrófagos. Por lo tanto, esta vía metabólica de los ligandos endocannabinoides parece tener un papel relevante en la regulación de la respuesta inflamatoria<sup>277</sup>. Es interesante como el efecto de ciertos antiinflamatorios no esteroideos de muy baja potencia para la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, sin embargo, son capaces de inhibir esta reacción de oxidación de endocannabinoides mediada por la COX-2<sup>270</sup>.

En cuanto al metabolismo de estos productos, se sabe muy poco de los derivados PG-EA, pero los PG-GE se hidrolizan a prostaglandinas mayoritariamente por la acción de la lisofosfolipasa A<sub>2</sub><sup>269</sup>.

La diferencia estructural entre el ácido araquidónico y la AEA permite la inhibición selectiva de la enzima COX-2, de tal modo que se inhiba la oxidación de la AEA sin interferir en la síntesis de prostaglandinas. Además, a pesar de que la COX-2 también tiene capacidad oxidativa sobre otras NAEs, tiene mayor afinidad por la AEA, por lo que, bloqueando esta vía, se produce un incremento mayoritario de los niveles de AEA. De esta forma, obtenemos una elevación del tono endocannabinoide de forma más selectiva que inhibiendo directamente la enzima FAAH<sup>259</sup>.

En segundo lugar, nos encontramos **la vía de las LOX**. Tanto AEA como 2-AG son sustratos de las enzimas 15-LOX y 12-LOX. Los metabolitos derivados de la AEA, hidroxianandamida (HAEA) tienen actividad sobre los receptores cannabinoides clásicos, el receptor PPAR $\alpha$  y el receptor TRPV1, además de tener la capacidad de actuar sobre alguna enzima del SEC y de modificar las propiedades de la membrana plasmática<sup>269,270</sup>. Los productos de 15-LOX derivados del metabolismo de la AEA a su vez, pueden ser metabolizados por glutatión transferasas y formar exoamidas<sup>269</sup>. Además, otros ácidos grasos relacionados con el SEC, como la DHEA, N-ArGly y NAT también son susceptibles a la acción de las LOX. Concretamente, el 17-hidroxi-DHEA es un metabolito natural que se encuentra en el cerebro de ratón y presenta propiedades protectoras<sup>278</sup>.

Por último, cabe destacar **el catabolismo de endocannabinoides por enzimas del complejo citocromo P450**. Se han identificado metabolitos de la AEA derivados de la acción de los citocromos CYP3A4, CYP2D6, CYP4F2 y CYP2J2, algunos de ellos con actividad sobre los receptores cannabinoides clásicos. Concretamente, un derivado de la AEA, el epóxido en C5-C6 de la AEA, la etanolamida de ácido 5,6-epoxieicosatrienoico, se ha identificado como potente agonista selectivo del receptor CB<sub>2</sub><sup>269,270</sup>. En el caso del 2-AG, también se han encontrado metabolitos derivados de la actividad de citocromo con actividad cannabinoide<sup>269</sup>. En la **Figura 12** se muestran las principales vías metabólicas de los principales ECs.

## Transporte de endocannabinoides

Debido al carácter lipofílico de los endocannabinoides, numerosos estudios han tratado de dilucidar el mecanismo por el cual estas moléculas son capaces de alcanzar sus dianas de acción desde sus lugares de síntesis, atravesando las diversas barreras físicas (como las membranas de los diferentes compartimentos celulares) que aparecen hasta llegar a los lugares donde ejercen su actividad biológica. En otras palabras, se ha tratado de identificar la existencia o no de transportadores para los endocannabinoides<sup>269</sup>. Los endocannabinoides en general se sintetizan a demanda y son liberados al espacio extracelular, desde donde actúan en los receptores cannabinoides localizados en la cara externa de la membrana plasmática de la célula diana. Sin embargo, en ocasiones, estos ligandos del sistema atraviesan la membrana plasmática de la célula diana, y son transportados por proteínas intracelulares a sus localizaciones intracelulares, incluidas membranas de orgánulos y mitocondrias, receptores nucleares o enzimas catabólicas, donde posteriormente ejercen su efecto o son desactivados<sup>208,269</sup>. Estos efectos se ejercen de manera coordinada, en el momento preciso y con la intensidad adecuada para generar una respuesta apropiada a un estímulo.

Se han propuesto diversos mecanismos de transporte de ECs, entre los que se incluyen el transporte facilitado a través de la membrana, el secuestro intracelular, la formación de complejos entre la AEA y moléculas de colesterol y la difusión pasiva determinada por la acción de la enzima FAAH, ya que debido a la degradación de endocannabinoides que ejerce esta enzima, se genera una fuerza motriz que favorece un determinado gradiente direccional en el transporte<sup>270,279</sup>. Teniendo en cuenta el preciso sistema de transporte y su carácter hidrofóbico, cabe plantearse, por un lado, la existencia de depósitos intracelulares de almacenamiento que permitan una disponibilidad inmediata de ligandos, y por el otro lado, proteínas transportadoras o chaperonas que lleven a estos ligandos a sus objetivos moleculares. Estas, además, presumiblemente estarán involucradas también en los posibles mecanismos de recaptura y transporte para su degradación<sup>208,270</sup>.

Como ya comentamos antes, en el caso de la AEA, se han identificado acúmulos de este ligando en los adiposomas, que son los compartimentos intracelulares de reserva lipídica de los organismos., así como la existencia de transportadores intracelulares de AEA (AITs, por sus siglas en inglés), entre los que se encuentran la proteína de estrés térmico Hsp70, la albúmina y las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) 5 y 7<sup>270</sup>. Los mecanismos de recaptura de AEA son únicos, en el sentido que están acoplados al proceso de degradación metabólica por la enzima FAAH localizada en el retículo endoplasmático. La enzima FAAH, al degradar el ligando, genera un desequilibrio en las concentraciones de AEA entre el interior y el exterior de la célula, lo que provoca un gradiente de recaptura. De hecho, las tasas de recaptura generalmente correlacionan con la abundancia de la enzima en las células, y una inhibición de la enzima FAAH, en general implica un descenso en la tasa de captura de AEA por parte de la célula<sup>280</sup>. En 1994 fue la primera vez que se confirmó y se postuló el mecanismo por el cual la AEA era recapturada al interior celular<sup>281</sup>. Sin embargo, muchas de las proteínas propuestas como transportadores de AEA se han quedado en el camino<sup>280</sup>.

En 2009, Howlett y colaboradores identificaron a las FABPs como AITs<sup>280</sup>. Estudios cristalográficos han demostrado que la AEA se une a la FABP5 con su cadena lipofílica y mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la etanolamina a un residuo Tyr<sup>131282</sup>. Se ha sugerido el papel de estas proteínas transportadoras en la regulación de otros NAEs, además

de la AEA, de manera que puede interferir de manera indirecta en el transporte y captación de esta<sup>270,283</sup>. En este sentido, estudios en modelos animales que carecen de las proteínas FABP5 y 7 han mostrado un incremento en los niveles de AEA, PEA y OEA<sup>284</sup>.

## **Farmacología del sistema endocannabinoide**

A partir de la identificación de los componentes mayoritarios de la planta *C. sativa*, se han desarrollado una serie de moléculas sintéticas o semisintéticas que han servido como herramientas experimentales más selectivas y potentes que los propios fitocannabinoides, lo que ha posibilitado principalmente el estudio farmacológico de este sistema al completo. Esto ha hecho que muchos de estos compuestos se han propuesto como herramientas de interés por su potencial terapéutico. En función de su perfil de actuación sobre los receptores cannabinoides clásicos, podemos clasificar los ligandos cannabinoides en tres grandes grupos en función de su perfil de acción: agonistas, antagonistas o agonistas inversos y moduladores alostéricos. Si además atendemos a su estructura química, podemos hacer una subdivisión entre los agonistas (clásicos, no clásicos, eicosanoides y aminoalquilindoles) y los antagonistas (diarilpirazoles y otras series)<sup>153</sup>. Por otro lado, en función de su naturaleza, lo podemos clasificar en ligandos sintéticos, moléculas de señalización endógenas y derivados de origen botánico.

### **Agonistas**

Se denomina agonista a los compuestos que son capaces de unirse al receptor y desencadenar una respuesta biológica. Los compuestos agonistas estabilizan el estado conformacional activado del receptor promoviendo las respuestas mediadas por estos. Esto incrementa la proporción de receptores en estado activado frente a receptores inactivos<sup>285</sup>.

#### **Agonistas cannabinoides Clásicos**

Los cannabinoides clásicos son aquellos compuestos derivados de la estructura química dibenzopirano con un anillo tricíclico. Se incluyen en este grupo a los principales cannabinoides derivados de la planta y a los análogos sintéticos de estos compuestos. El fitocanabinoide más estudiado de este grupo es el  $\Delta^9$ -THC, seguido de su isómero  $\Delta^8$ -THC, ambos agonistas tanto del receptor CB<sub>1</sub> como de CB<sub>2</sub>. Dentro de los cannabinoides sintéticos clásicos, cabe destacar al dimetilheptil-11-hidroxitetrahidrocannabinol (HU210) y el desacetil-L-nantradol<sup>153</sup>. En general, los derivados sintéticos son agonistas mucho más potentes, y los efectos sobre los receptores son mucho mayores, hasta el punto de que, en ocasiones, los efector farmacológicos in vivo son excepcionalmente duraderos.

#### **Agonistas cannabinoides no clásicos**

Los cannabinoides no clásicos son compuestos sintéticos análogos bicíclicos y tricíclicos del  $\Delta^9$ -THC que carecen del anillo dihidropirano. Los primeros compuestos de estas características fueron sintetizados por la compañía farmacéutica Pfizer, siendo el compuesto CP47497 el compuesto prototípico de este grupo<sup>286</sup>. Posteriormente se desarrolló el análogo bicíclico

CP55940, que ha sido en uno de los principales ligandos de los receptores cannabinoides con actividad agonista utilizados en investigación, resultando en una herramienta esencial en la caracterización del receptor CB<sub>1</sub><sup>138,153</sup>.

#### Aminoalquilindoles

Hasta principios de la década de los 90, todos los compuestos cannabimiméticos sintetizados derivaban estructuralmente del  $\Delta^9$ -THC. Sin embargo, este grupo de moléculas, derivadas estructuralmente de la pravadolina, han demostrado altas afinidades por los receptores cannabinoides<sup>287</sup>. El compuesto más característico de este grupo es el R-(+)-WIN55212<sup>288</sup>. Este compuesto muestra una alta afinidad por ambos receptores cannabinoides, aunque ligeramente mayor para el receptor CB<sub>2</sub><sup>289</sup>. Este compuesto presenta un sitio de unión diferente en el receptor CB<sub>1</sub> que los cannabinoides clásicos y no clásicos, aunque es capaz de producir el desplazamiento de estos de su lugar de unión cuando está presente<sup>153</sup>.

#### Derivados eicosanoides

A este grupo pertenecen los compuestos derivados de los endocannabinoides, concretamente del ácido araquidónico y de otros ácidos grasos poliinsaturados. Dentro de los eicosanoides endógenos, el miembro más importante es la AEA, seguido del 2-AG. Estos ligandos presentan alta afinidad por ambos receptores, pero su potencia de acción es muy limitada, probablemente debido a la facilidad para degradarlo que presentan las enzimas que forman parte de este preciso sistema. La

modificación estructural de estos endocannabinoides ha permitido desarrollar compuestos más estables y con una afinidad potenciada. Este es el caso de la metanandamida (AM356), un derivado de la AEA con un centro quiral que potencia su afinidad. Así, el isómero quiral R-(+)-es nueve veces más afín que el isómero S-(-)-<sup>290</sup>. La gran selectividad del isómero R por el receptor CB<sub>1</sub> deriva de la introducción de un grupo metilo sobre el carbono 1, un cambio estructural que le confiere mayor resistencia a la acción hidrolítica de la FAAH<sup>153</sup>. Otros derivados eicosanoides de gran relevancia son el araquidonoil-

| Nombre del compuesto   | Efecto sobre el SEC  |
|--|--|
| <b>Derivados de <i>C. sativa</i></b>   |  |
| $\Delta^9$ -THC.<br>CBD<br>CBG<br>$\Delta^9$ -THCV                             | Agonismo parcial, antagonismo o agonismo inverso mixto CB <sub>1</sub> y CB <sub>2</sub> . Dependiente de ensayo/condición |
| <b>Endocannabinoides</b>   |  |
| AEA  | Agonismo mixto con mayor selectividad por CB <sub>1</sub>  |
| 2-AG   | Agonismo mixto con mayor selectividad por CB <sub>2</sub>  |
| <b>Compuestos sintéticos</b>   |  |
| HU210<br>WIN 55,212-2<br>CP 55940  | Agonismo mixto CB <sub>1</sub> y CB <sub>2</sub> .   |
| ACEA   | Agonismo selectivo CB <sub>1</sub> .   |
| Metanandamida  | Agonismo selectivo CB <sub>1</sub> resistente a la FAAH  |
| JWH-015<br>JWH-133<br>HU910<br>HU-308<br>AM1241<br>O-1966<br>O-3853<br>LEI-101 | Agonismo selectivo CB <sub>2</sub> .   |
| SR141716A<br>AM251   | Agonismo inverso/ antagonista selectivo CB <sub>1</sub> .  |
| Taranabant<br>SR144528<br>AM630<br>JTE-907                                     | Agonismo inverso/ antagonista selectivo CB <sub>2</sub> .  |
| PF-3845<br>URB597<br>URB937  | Inhibidores de FAAH  |
| BIA 10-2474<br>JNJ-42165279<br>JZL-184   | Inhibidores del MAGL   |
| JZL-195 (FAAH y MAGL)<br>KML29<br>JZP361<br>URB602                             | Inhibidores de los transportadores putativos de endocannabinoides  |
| AM404<br>BSL-34<br>OMDM-2<br>UCM707<br>VDM11                                   | Inhibidores de DAGL  |
| KT-109<br>LEI-105  |  |

**Tabla 2.** Ejemplos de moduladores del metabolismo o la señalización endocannabinoide, naturales o sintéticos. Adaptado de Paloczi et al 2018

2-cloroetilamida (ACEA), agonista selectivo del receptor CB<sub>1</sub>, la araquidonoilciclopropilamida (ACPA)<sup>291</sup> y el O-1812<sup>292</sup>. Ni la ACEA ni el ACPA parecen tener ninguna ventaja estructural frente a su hidrólisis por la FAAH, presumiblemente por no tener ese grupo metilo de sustituyente<sup>153,293</sup>.

### Antagonistas y agonistas inversos

Los compuestos antagonistas son moléculas con capacidad de unión a los receptores, pero que, a diferencia de los anteriores, bloquean el inicio de la respuesta biológica. Independientemente del estado conformacional del receptor, los antagonistas se unen a este y lo atrapan en el estado de actividad en el que se encuentra en ausencia de ligando. En el caso de que un ligando se comporte como agonista inverso, se unirá al receptor en su conformación inactiva estabilizándola, disminuyendo constitutivamente la señalización del receptor<sup>285</sup>. Por lo tanto, un agonista inverso no sólo bloquea su activación, sino que otorga a los receptores nuevas propiedades farmacodinámicas, aumentando su umbral de activación por encima de las condiciones normales. Estos compuestos son excelentes herramientas experimentales para el estudio de las vías de señalización, y a lo largo de la historia se han ido desarrollando numerosos compuestos antagonistas para este fin.

#### Diarilpirazoles

Los miembros más importantes de esta serie son dos compuestos diseñados y sintetizados por los laboratorios Sanofi-Synthelabo, el SR141716A, conocido como Rimonabant y comercialmente como Acomplia<sup>®</sup>, un potente ligando selectivo del receptor CB<sub>1</sub>, y SR144528, un potente ligando selectivo del receptor CB<sub>2</sub>. Ambos ligandos son capaces de revertir los efectos mediados por los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> respectivamente<sup>294,295</sup>. Además, ambos ligandos pueden producir los efectos contrarios a los producidos por los agonistas de los receptores cannabinoides, por lo que se comportan como agonistas inversos<sup>295,296</sup>.

Posteriormente se diseñaron dos análogos de SR141716A que también eran capaces de bloquear la cascada de señalización iniciada por el receptor CB<sub>1</sub>, el AM251 y el AM281. Ambos análogos comparten la capacidad del compuesto SR141716A para atenuar las respuestas a los agonistas, además de tener la capacidad de comportarse como agonistas inversos<sup>153</sup>.

#### Otras series

Además de los compuestos derivados de los diarilpirazoles, se han diseñado compuestos de otra naturaleza química, como el aminoalquilindol, 6-iodopravadolina (AM630). Este compuesto es un antagonista/agonista inverso selectivo de los receptores CB<sub>2</sub><sup>153</sup>, aunque ciertos trabajos han observado una cierta afinidad por los receptores CB<sub>1</sub> a altas concentraciones de compuesto<sup>297,298</sup>, así como su capacidad de actuar como “*protean agonist*” en ciertos ensayos celulares<sup>299</sup>.



## Modificadores del tono endocannabinoide

Como sistema regulador de otros sistemas, el SEC está implicado de manera compleja en numerosos procesos biológicos. Gracias a la identificación de los mecanismos de regulación y control del SEC, se ha podido comprobar que no sólo los receptores cannabinoides representan una potencial diana terapéutica, y se ha comprobado que la modulación de los niveles endógenos de AEA tiene un valioso potencial terapéutico. Existen numerosos puntos de regulación de este sistema, incluidos los elementos que participan en los procesos de síntesis y degradación, o los mecanismos de transporte y recaptura, que pueden ser modulados farmacológicamente.

Así, a lo largo de los años se han ido diseñando moléculas capaces de actuar a diferentes niveles del sistema para obtener un fin común, el mantenimiento, la reducción o potenciación del tono endocannabinoide.

### Inhibidores de la síntesis

Recientemente se han desarrollado nuevas aproximaciones farmacológicas para la modulación del tono endocannabinoide, centrándose en la inhibición de las enzimas de síntesis de endocannabinoides, tanto de la AEA como del 2-AG. Este es el caso del compuesto LEI-401, un inhibidor de la enzima NAPE-PLD, que bloquea la síntesis de AEA fisiológicamente emula los efectos de los antagonistas del receptor CB<sub>1</sub>. Además, acciones de este compuesto pueden ser revertidas mediante el bloqueo de la degradación de endocannabinoides<sup>300</sup>. Así mismo, se han desarrollado inhibidores de la síntesis de ambas isoformas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de la enzima DAGL<sup>301,302</sup>.

### Inhibidores de la degradación

Otra de las estrategias experimentales más utilizadas para la caracterización del SEC fue la utilización de moléculas que inhiben la degradación de los endocannabinoides. Posteriormente, estos compuestos han mostrado su potencial como estrategia terapéutica, aumentando el tono endocannabinoide. El primer inhibidor de la enzima FAAH descrito fue el inhibidor de proteasas de serina, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, por sus siglas en inglés) que, a pesar de su alta inespecificidad, se ha utilizado en numerosos ensayos preclínicos<sup>280</sup>. Este inhibidor de proteasas también ha mostrado tener actividad inhibitoria para la enzima MAGL<sup>303</sup>. Posteriormente se desarrollaron otros inhibidores sintéticos que, a pesar de tener muy buena actividad sobre la enzima FAAH (capacidad de inhibición del 100%) y cierta actividad sobre la MAGL, también se unían débilmente al receptor CB<sub>1</sub>. Este es el caso del AM374<sup>303,304</sup>. Otros inhibidores de la enzima FAAH desarrollados son el URB597, PF3845, PF04457845, BIA10-2474 y el JNJ-42165279. Sin embargo, la eficacia de estos compuestos en la Clínica se ha visto empañada por los efectos secundarios que algunos de ellos producían, y varios ensayos clínicos tuvieron que suspenderse<sup>280</sup>.

A nivel farmacológico, es importante tener en cuenta que la selectividad de estas enzimas no es exclusiva de sustrato, por lo que la inhibición de FAAH o NAAA pueden elevar los niveles de otras amidas de ácidos grasos, provocando la activación de vías de señalización independientes de los receptores cannabinoides clásicos<sup>245,272</sup>. Además, a la hora de usar la inhibición de la FAAH como estrategia para aumentar el tono endocannabinoide, hay que tener en cuenta que esta puede provocar la activación de otras vías de degradación de AEA, como la vía de la NAAA, alterando otras funciones celulares.

La investigación también ha avanzado en la búsqueda de inhibidores de la MAGL, como el compuesto OMDM169 y el JZL184<sup>305</sup>. Existen otros, como el compuesto URB754, y el URB602, aunque algunos trabajos han cuestionado su especificidad y actividad<sup>306,307</sup>. A día de hoy continúa la búsqueda de herramientas farmacológicas útiles, que además sean aplicables en la clínica, para modular el SEC actuando sobre sus enzimas de degradación.

Por último, también cabe mencionar la inhibición farmacológica de las vías de transformación de los endocannabinoides, como por ejemplo la degradación oxidativa por parte de la enzima COX-2. La inhibición de la enzima COX-2 podría representar una ventaja, ya que la diferencia estructural entre el ácido araquidónico y la AEA permite una inhibición selectiva de la enzima COX-2, de tal modo que se inhiba la oxidación de la AEA sin interferir en la síntesis de prostaglandinas. Además, a pesar de que la COX-2 también tiene capacidad oxidativa sobre otras NAEs, tiene mayor afinidad por la AEA, por lo que, bloqueando esta vía, se produce un incremento mayoritario de los niveles de AEA. De esta forma, se obtiene una elevación del tono endocannabinoide de forma más selectiva que inhibiendo directamente la enzima FAAH<sup>259</sup>.

#### Inhibiciones de la recaptura/transporte

Además de los inhibidores de la degradación, se han desarrollado otras estrategias, incluida la inhibición del transportador de AEA. A este nivel, se pueden encontrar diversos inhibidores como el UCM707, OMDM1, OMDM2 y el AM1172<sup>308</sup>. De la misma forma, la inhibición específica de las proteínas FABPs ha mostrado tener también un efecto potenciador de la señal endocannabinoide al incrementar los niveles de AEA. La inhibición de estas chaperonas reduce el transporte de AEA hacia las enzimas de degradación y modifica el gradiente de concentración de AEA que genera la enzima FAAH. Dos de los inhibidores sintetizados para este fin son el SBF126<sup>309</sup> y el BMS309403<sup>309</sup>.

Estudios computacionales han mostrado que las FABP3, FABP5 y FABP7 tienen afinidad por el  $\Delta^9$ -THC y por el CBD y funcionan como sus transportadores intracelulares<sup>310</sup>. Además,  $\Delta^9$ -THC y CBD son capaces de inhibir la recaptura y el catabolismo de la AEA a través de su unión a las proteínas transportadoras FABPs<sup>280</sup>. Además, estas proteínas transportadoras tienen cierta especificidad de tejido<sup>309</sup>, por lo que nos encontramos con la posibilidad de desarrollar inhibidores específicos de órgano, con la ventaja de evitar los efectos secundarios indeseados observados en los inhibidores de FAAH.

#### Moduladores alostéricos

Los moduladores alostéricos son moléculas que se unen a zonas del receptor diferentes al centro activo de la mayoría de sus ligandos, por lo que no compiten por el sitio de unión. Sin embargo, su unión produce modificaciones estructurales y funcionales en los receptores que pueden llevar, como consecuencia, a potenciar o reducir el efecto de los agonistas del sitio ortostérico, y a alterar la preferencia de vía de señalización de los receptores cannabinoides<sup>285</sup>. La modulación alostérica es una estrategia farmacológica altamente interesante, ya que permite intensificar o atenuar la respuesta de los receptores a un estímulo endógeno de los endocannabinoides. Se han desarrollado moduladores alostéricos tanto para el receptor CB<sub>1</sub> como para CB<sub>2</sub>, como por ejemplo los compuestos sintéticos PSNCBAM-1 y Org27569 para el receptor CB<sub>1</sub> o el fitocannabinoide CBD para ambos receptores<sup>311-315</sup>.

### Cuadro 9. CANNABINOIDES SINTÉTICOS COMO HERRAMIENTAS ESENCIALES PARA EL ESTUDIO DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES EN PROCESOS BIOLÓGICOS Y EN PATOLOGÍA.

Desde el descubrimiento de la estructura química de los principales fitocannabinoides, se han diseñado cientos de análogos estructurales como herramientas esenciales para la identificación de sus acciones farmacológicas y el descubrimiento de los receptores cannabinoides y otros elementos del sistema.

Como ya se mencionó anteriormente, los GPCR cuentan con una vasta diversidad de respuesta, debido a la variedad efectores con los que se asocian. De manera general, las GPCR funcionan sobre unas vías de señalización preferenciales, desde las que ejercen sus funciones fisiológicas, ya sea una vía de manera selectiva o varias vías superpuestas. Sin embargo, la unión de un ligando puede modular el estado conformacional del receptor, estabilizando una conformación respecto a otra. De este modo nos encontraríamos con dos situaciones diferentes.

Primero, el denominado “*Strength of signal*”, que hace referencia a la preferencia por una cascada de señalización. En este caso, un agonista parcial solo es capaz de activar completamente esta vía, mientras que sobre las demás ejerce un efecto muy débil. Por otro lado, se puede dar el fenómeno conocido como “*Biased-agonism*”, en el que el agonista estabiliza preferencialmente un estado activador sobre los demás, careciendo de efecto sobre las demás vías. Lo más interesante de este último, es el hecho de que la vía que se activa selectivamente en este caso no es obligatoriamente la vía preferencial del receptor, por lo que se produce una **SELECTIVIDAD FUNCIONAL**<sup>150</sup>. Este fenómeno se da en la mayoría de los agonistas CB<sub>2</sub><sup>552</sup>.

Los ligandos con afinidad por los receptores cannabinoides son estructural y farmacológicamente muy diversos. No es sorprendente por lo tanto que cada uno de ellos presente cierta selectividad a la hora de modular las diferentes vías de señalización de los receptores. A continuación, se detallan ciertos ligandos sintéticos que han servido de gran utilidad como herramientas experimentales.

**WIN55212,2:** Agonista de tipo aminoalquilindol, derivado de la pravadolina<sup>288</sup>. Este compuesto ejerce un agonismo no selectivo en ambos rCBs. En el caso de CB<sub>1</sub>, WIN55 212,2 ejerce una activación máxima de la vía de señalización mediada por G<sub>i</sub> y submáxima por G<sub>o</sub>.

En este caso, se produce el fenómeno de *Strength of signal*, ya que el receptor CB<sub>1</sub> está acoplado de manera preferente a G<sub>i</sub>. Además, es capaz de activar las vías G<sub>s</sub> y G<sub>q/11</sub><sup>150</sup>. En el caso de la activación de pERK, activación de los canales de potasio GIRK, así como la activación de la vía de β-arrestinas, se comporta como un agonista para ambos receptores, aunque en el caso de CB<sub>2</sub> tiene preferencia por la vía ERK<sup>552</sup>.

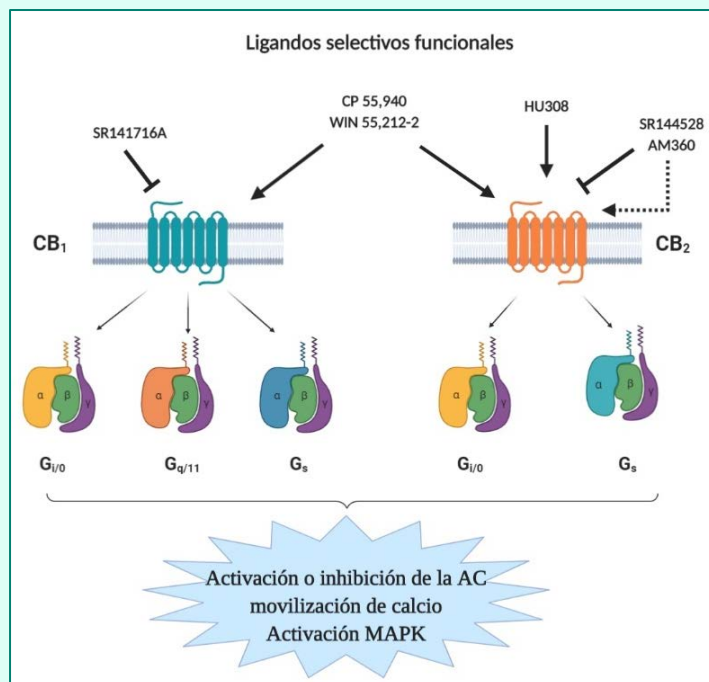
**CP55,940:** Agonista no selectivo para ambos receptores cannabinoides. Gracias a este cannabinoides se identificó la actividad biológica del Δ<sup>9</sup>-THC y a sus análogos. En el receptor CB<sub>1</sub>, este compuesto presenta preferencia por la vía G<sub>i/o</sub> frente a G<sub>s</sub> y no activa las vías de G<sub>q/11</sub>. Además, es el agonista más efectivo en activar las vías de JNK<sup>150,700</sup>. En ambos receptores activan con gran potencia la vía de las β-arrestinas para la sensibilización del receptor. Además, se ha visto su capacidad para activar los canales GIRK a través de ambos receptores.

**HU308:** Agonista selectivo CB<sub>2</sub><sup>513</sup>. A diferencia de otros agonistas, el HU308 es una excelente herramienta farmacológica ya que funciona como un agonista muy equilibrado y, a excepción de su modulación parcial de la vía de β-arrestinas, actúa sobre todas las vías de señalización del receptor CB<sub>2</sub> de manera muy similar. Este compuesto inhibe el transportador de recaptura de AEA y es agonista TRPA1 en el rango micromolar<sup>552</sup>.

**SR141716A:** Antagonista selectivo CB<sub>1</sub><sup>294</sup>. Tiene actividad de agonista inverso sobre las vías mediadas por proteínas G<sub>i/o</sub>, G<sub>s</sub> y G<sub>q/11</sub>. Además, este compuesto actúa inhibiendo la enzima ABHD12, la recaptura de AEA y es ligando de los canales TRP, con afinidad nanomolar por los TRPM8<sup>552</sup>.

**SR144528:** Antagonista selectivo CB<sub>2</sub><sup>295</sup>. Su acción es selectiva para la señalización de la AC, pero no tiene efecto sobre GIRK o pERK. Es una herramienta farmacológica muy adecuada, debido a su selectividad de vía y que no presenta efectos independientes al receptor CB<sub>2</sub><sup>552</sup>.

**AM630:** Potente agonista inverso del receptor CB<sub>2</sub>. Este compuesto es de la clase de los aminoalquilindol, derivado de la pravadolina<sup>334</sup>. Ciertos estudios han mostrado la capacidad del AM630 de funcionar como un “*protean agonist*”, es decir, una molécula capaz de estabilizar la conformación inactiva del receptor cuando está constitutivamente activado, pero que cuando su actividad constitutiva está muy reducida, son capaces de estabilizar la conformación activa<sup>334,701</sup>. Este antagonista es además un potente agonista de los receptores TRPA1.



## Derivados botánicos cannabinoides

Los fitocannabinoides son derivados naturales exclusivos del género *Cannabis*. Dentro de este grupo, los más abundantes son el CBD y el  $\Delta^9$ -THC. A este último se le atribuyen principalmente los efectos psicoactivos del cannabis. Sin embargo, existen numerosos constituyentes en la planta con capacidad moduladora del SEC. Se han publicado numerosos trabajos sobre fitocannabinoides y otros componentes no exclusivos de la planta con propiedades farmacológicas mediadas por los receptores cannabinoides clásicos. Además, estos fitocannabinoides pueden actuar sobre otros receptores no clásicos e incluso diferentes elementos de la maquinaria del SEC. Se han identificado más de 104 fitocannabinoides<sup>134,316</sup>, siendo unos pocos los que se han estudiado en relación a su potencial para su aplicación clínica. De los más de 100 fitocannabinoides caracterizados, únicamente se le atribuye capacidad de activar los receptores clásicos CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> de manera biológicamente relevante a cuatro. Es el caso del  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCV,  $\Delta^8$ -THC y el CBN. Actualmente no se ha establecido ningún otro fitocannabinoides con capacidad de activar estos receptores con potencia significativa, categorizando a estos fitocannabinoides como constituyentes psicoactivos, pero no psicotrópicos, del cannabis. Entre estos encontramos el cannabicromeno (CBC), cannabidiol CBD, CBDV, CBDA, CBG, cannabigerovarina (CBGV), el ácido cannabigerólico (CBGA), el ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico (THCA) y el ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabivarínico (THCVA)<sup>134</sup>. A continuación, se detallan los más interesantes para el desarrollo de este trabajo.

### $\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol

El  $\Delta^9$ -THC, presenta alta afinidad por los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub><sup>317-319</sup>, actuando como un agonista de baja potencia o agonista parcial. Gracias a la aplicación de  $\Delta^9$ -THC como herramienta farmacológica, se descubrieron una serie de efectos característicos catalogados como la tétada cannabinoide, que incluye supresión de la locomoción, hipotermia, antinocicepción y catalepsia. Todos estos efectos se han atribuido a la activación del receptor CB<sub>1</sub> por parte de este compuesto y son, o bien bloqueados por el antagonista selectivo SR141716A, o bien inexistentes en un modelo in vivo de ratones que carecen dicho receptor. Por otro lado, se le ha atribuido a este receptor su capacidad de activar los receptores CB<sub>2</sub> produciendo efectos similares a los que produce el agonista sintético selectivo JWH133, y ambos efectos son revertidos por el antagonista selectivo SR144528<sup>134</sup>.

Debido a su buena afinidad, pero baja potencia de acción, en ocasiones el  $\Delta^9$ -THC se comporta como antagonista de otros agonistas, ya que compite con estos por el sitio de unión, y por tanto disminuye su acción sobre el receptor. De igual modo, en ensayos de actividad el  $\Delta^9$ -THC es capaz de provocar un desplazamiento de la curva dosis/respuesta de otros agonistas hacia concentraciones más altas. Sin embargo, cuando se administra el  $\Delta^9$ -THC solo, sigue comportándose como un agonista. Esto ocurre generalmente en tejidos donde el receptor se encuentra poco expresado o la señal que genera es poco eficiente<sup>134</sup>. En el caso de los receptores CB<sub>2</sub>, algunos estudios han observado el comportamiento de agonista inverso del  $\Delta^9$ -THC en cultivos celulares con sobreexpresión del receptor<sup>320</sup>.

Además, el  $\Delta^9$ -THC puede ejercer su acción sobre otras dianas del sistema, como receptores, por ejemplo GPR55<sup>321</sup>, PPAR $\gamma$ <sup>322</sup> o GRP18<sup>210</sup>, canales iónicos como los receptores TRPV, TRPV2, TRPA1, TRPM8<sup>226,323,324</sup> y enzimas como las ciclooxigenasas y lipoxigenasa<sup>325</sup>, o enzimas relacionadas con el complejo citocromo P450, CYP2D6 y CYP3A4<sup>326-329</sup>, entre

otras. Asimismo, se ha descrito la capacidad de este fitocannabinoide de alterar procesos de recaptura de los ligandos endógenos del sistema<sup>330</sup> e incluso los procesos de recaptura de ciertos NTs<sup>331</sup>. Además, el  $\Delta^9$ -THC presenta afinidad por los receptores de serotonina 5HT<sub>3A</sub> a condiciones submicromolares<sup>134</sup>.

Debido a sus diversas actividades farmacológicas, actuando sobre diferentes sustratos a nivel central y periférico, el  $\Delta^9$ -THC participa modulando numerosos procesos tan diferentes como la analgesia, el apetito, el estado anímico, el sueño o la inflamación<sup>332</sup>. En consecuencia, la aplicación clínica de este compuesto se ha visto limitada, ya que el uso terapéutico de  $\Delta^9$ -THC general conlleva la aparición de efectos secundarios no deseados.

### $\Delta^9$ -tetrahidrocannabivarina

La  $\Delta^9$ -THCV es un agonista parcial del receptor CB<sub>2</sub><sup>316,333,334</sup> con una afinidad por el receptor similar a la del  $\Delta^9$ -THC<sup>333,334</sup>. Como agonista parcial, presenta un comportamiento agonista/antagonista en función de las condiciones del ensayo realizado. En presencia de un agonista más potente y condicionado por los niveles de expresión del receptor, el  $\Delta^9$ -THCV se comporta como un antagonista del receptor CB<sub>2</sub>. Así, este compuesto es capaz de antagonizar el efecto de agonistas como el CP55940 o WIN55212, e incluso del  $\Delta^9$ -THC, en ensayos de actividad tanto in vitro como ex vivo<sup>335</sup>.

Además, este compuesto muestra gran afinidad por el receptor CB<sub>1</sub><sup>335,336</sup>, aunque el efecto que ejerce sobre este es de antagonista neutro. Ensayos de unión a receptor sugieren que, a pesar de tener alta afinidad con el receptor CB<sub>1</sub>, la eficacia del  $\Delta^9$ -THCV para ejercer una actividad es muy pobre<sup>333,336,337</sup>. Por lo tanto, su efecto antagonista reside en que, en presencia del  $\Delta^9$ -THCV, un agonista selectivo es incapaz de unirse al receptor y ejercer su activación<sup>316,335,336</sup>.

Además de sobre los receptores clásicos del SEC, a concentraciones elevadas, superiores a las necesarias para unirse a los receptores cannabinoides, el  $\Delta^9$ -THCV puede ejercer su acción como agonista indirecto modulando los niveles de los ligandos endógenos. Este efecto es resultado de la inhibición de los transportadores de AEA o inhibiendo la actividad de las enzimas de degradación FAAH y MAGL<sup>226</sup>.

Por otro lado, se le ha atribuido al  $\Delta^9$ -THCV efectos sobre receptores no canónicos relacionados con el SEC, modulando la actividad de receptores PPAR, el receptor GPR55<sup>338</sup>, los canales iónicos TRPM8, TRPA1, TRPV1-4<sup>225,339</sup> y sobre el receptor serotoninérgico 5HT<sub>1A</sub><sup>340</sup>, estrechamente relacionado con el SEC.

### Cannabidiol

El CBD fue el primer constituyente aislado de la planta del cannabis en los años 30, aunque hasta 1963 no fue identificada su estructura química<sup>134</sup>. Considerada molécula hermana del  $\Delta^9$ -THC, cuya maquinaria biosintética es prácticamente idéntica, este compuesto carece de actividad psicotrópica, aunque sí tiene un alto potencial terapéutico. En este sentido, se ha demostrado su efectividad frente a la inflamación, ansiedad, depresión, psicosis, convulsiones, náuseas, entre otros. Además, presenta un gran poder antioxidante y potencial neuroprotector<sup>316,341,342</sup>.

A diferencia del  $\Delta^9$ -THC, que mimetiza los efectos producidos por el 2-AG y la AEA, este fitocannabinoide funciona como potenciador o iniciador del SEC. Ciertos autores han descrito la interacción entre el  $\Delta^9$ -THC y el CBD como una “escopeta sinérgica”<sup>341,343,344</sup>. Por lo tanto, además de sus efectos propios, el CBD adicionalmente actúa junto a otros compuestos cannabinoides modulando su respuesta<sup>316</sup>. Ciertos autores han descrito esos efectos moduladores del CBD respecto al  $\Delta^9$ -THC asumiendo un efecto directo sobre el receptor CB<sub>1</sub>, bien como potencial antagonista o bien como modulador alostérico negativo, de forma que el CBD ejercería un bloqueo farmacodinámico directo sobre la acción activadora del  $\Delta^9$ -THC sobre CB<sub>1</sub><sup>345,346</sup>. Por otro lado, ciertos autores han descrito este efecto modulatorio sobre las acciones del  $\Delta^9$ -THC como acción independiente a un bloqueo directo del receptor CB<sub>1</sub><sup>316,347</sup>.

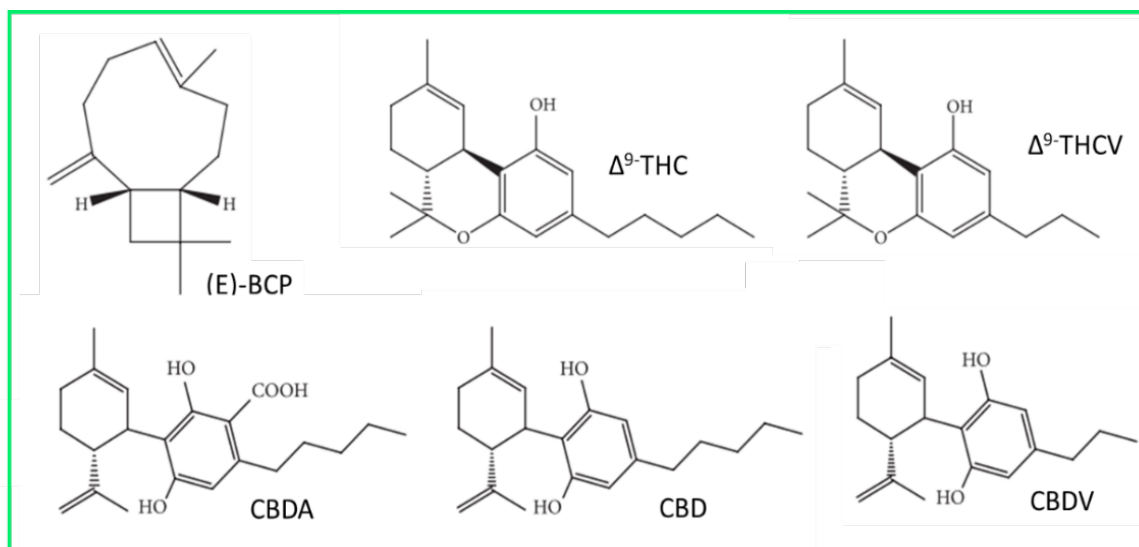
El CBD es considerado un cannabinoide atípico, ya que no desencadena los característicos efectos atribuidos a la activación del receptor CB<sub>1</sub>, la conocida tétrada cannabinoide. Este fitocannabinoide, sin embargo, sí que presenta cierta afinidad por el receptor, ya que es capaz de desplazar ligeramente a los agonistas cannabinoides en ensayos de unión de radioligando. Además, en ensayos de funcionalidad se comporta como agonista inverso de baja potencia del receptor CB<sub>1</sub>, siendo capaz de antagonizar el efecto de agonistas del receptor<sup>348</sup>. A pesar de esto, en ciertas condiciones de ensayo, como alta sobreexpresión del receptor y en el rango de concentración submicromolar, se ha observado un comportamiento de agonista CB<sub>1</sub> del CBD<sup>134</sup>. Por lo tanto, podría considerarsele un agonista parcial de muy baja potencia. En el caso de CB<sub>2</sub>, muestra un perfil de agonista inverso de muy baja potencia, ya que es capaz de antagonizar el agonista CP55940<sup>341–343,349</sup>. Sin embargo, este efecto se produce a concentraciones muy altas de compuesto, siendo estas biológicamente no relevantes.

Diversos estudios han mostrado ciertas acciones del CBD sobre elementos del SEC diferentes a los receptores clásicos, que como consecuencia desencadenan un efecto activador de los receptores. De hecho, los efectos de este compuesto pueden ser revertidos por agonistas inversos del receptor CB<sub>1</sub>. Todo esto sugiere que el CBD podría ejercer un efecto de agonismo indirecto sobre este receptor, ya sea aumentando el tono endocannabinoide (por la inhibición de las enzimas de degradación como la FAAH, inhibiendo el transportador putativo de AEA o aumentando de otra forma los niveles tanto de AEA como de 2-AG), o modificando las dinámicas de fluidez de la membrana, alterando así la actividad del receptor<sup>224,226,350–354</sup>. Además se le han atribuido otros efectos que afectan directamente a la farmacocinética del  $\Delta^9$ -THC, como la inhibición de algunas isoformas de la citocromo P450, responsables de su metabolismo a 11-OH- $\Delta^9$ -THC, un metabolito 4 veces más psicoactivo que el  $\Delta^9$ -THC<sup>316</sup>, o efectos en el sistema derivados de su propio metabolismo hacia 6 $\beta$ -OH- $\Delta^9$ -THC, un metabolito psicotrópico que produce catalepsia, nocicepción e hipotermia<sup>355</sup>. Otro ejemplo de esto es la inhibición no competitiva que ejerce el CBD sobre las isoformas de citocromo P450 CYP2A6, CYP2B6<sup>327</sup>, CYP3A4 y CYP3A5<sup>328</sup>, modulando de este modo el metabolismo hepático de otras sustancias.

Además, se ha descrito la capacidad del CBD de modular otros receptores relacionados con el SEC. Es el caso del antagonismo del receptor GPR55<sup>211</sup>, el agonismo parcial para el receptor GPR18<sup>210</sup> y la activación del receptor PPAR $\gamma$ <sup>356</sup>, que tiene efecto neuroprotector<sup>134,316</sup>.

Como efectos independientes a los receptores cannabinoides clásicos, podemos destacar la inhibición de la recaptura de adenosina, promoviendo el efecto antiinflamatorio beneficioso ejercido por esta<sup>357–359</sup>. Además, la reducción del factor

TNF $\alpha$  inducido por LPS producida por CBD se puede revertir, bien bloqueando los receptores de adenosina A<sub>2A</sub>, bien delecionando el receptor<sup>357-359</sup>. El CBD también tiene un papel importante en la regulación de los canales iónicos TRP, especialmente el TRP1A, cuyo efecto antinociceptivo vía activación de este receptor es antagonizado no solo bloqueando este receptor, sino también bloqueando los receptores CB<sub>1</sub>, 5HT<sub>1A</sub> y A<sub>1</sub> de adenosina. Además, el CBD ejerce su acción vía el canal iónico de glicina, responsable, al menos en parte, de su capacidad antiinflamatoria<sup>360</sup>.



**Figura 13. Estructura química de varios derivados fitocannabinoides.** (E)- $\beta$ -Cariofileno ((E)-BCP), (-)-trans- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), (-)-trans- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabivarina ( $\Delta^9$ -THCV), ácido cannabidiólico (CBDA), Cannabidiol (CBD) y cannabidivarina (CBDV). *Adaptado de Pertwee 2014.*

### Cannabidivarina

A pesar de ser identificado y aislado en los años 70<sup>361</sup>, no se ha comenzado a estudiar el potencial farmacológico de la cannabivarina hasta hace relativamente poco tiempo. Este fitocannabinoide tiene un perfil farmacológico diferente, ya que no presenta rangos de actividad biológicamente relevantes por los receptores cannabinoides clásicos<sup>362</sup>. Sin embargo, se ha encontrado efecto de la CBDV en otras dianas del SEC y en elementos relacionados.

Por un lado, nos encontramos con los canales iónicos TRP, altamente involucrados en el potencial terapéutico de este compuesto. Esto se debe a que la CBDV es capaz de modular la activación de una gran parte de los receptores de esta familia, teniendo en ocasiones un papel dual, siendo capaz de activarlos y a la vez de desensibilizarlos para otros activadores<sup>134,226,339</sup>. Este es el caso de los receptores TRPV1, TRPV2, TRPV4 y TRPA1. Por otro lado, la CBDV bloquea la activación del canal TRPM8.

Por otro lado, ciertos trabajos implican a la CBDV en la modulación de la maquinaria metabólica del SEC. Así, se ha descrito que la CBDV a altas concentraciones es capaz de inhibir ciertas enzimas encargadas tanto de la degradación de EC, como

es la NAAA, una de las enzimas responsable del catabolismo de la PEA, como de la síntesis, como es el caso de la DAGL $\alpha$ , enzima responsable de la síntesis de 2-AG. Además, es capaz de inhibir la recaptura de la AEA<sup>226</sup>.

### Ácido Cannabidiólico

La mayoría de los fitocannabinoides derivan de tres ácidos cannabinoides principales, el THCA, CBCA y CBDA, obteniéndose los diferentes componentes por transformaciones no enzimáticas como la descarboxilación por exposición a luz o calor o la autooxidación<sup>363–365</sup>. Junto al CBD, el CBDA, su precursor natural, es el mayor metabolito no psicotrópico en la planta de *Cannabis sativa*<sup>134,366</sup>. Fue aislado por primera vez por Krejci y colaboradores en 1955.

Se han descrito múltiples dianas para este fitocannabinoides. Por un lado, se ha descrito su capacidad de activación para los receptores TRPV1, TRPV3 y TRPV4, aunque con una eficacia muy baja, y en ocasiones una potencia no relevante en el ámbito biológico. Sin embargo, este compuesto es capaz de desensibilizar estos receptores para su ligando<sup>225,226,367</sup>. Además se ha descrito un agonismo de baja potencia para el receptor TRPA1, y de nuevo, su capacidad de desensibilizar al receptor es mayor a la de activarlo. Por otro lado, De Petrocellis y colaboradores han descrito su capacidad antagonista de muy baja potencia sobre los receptores TRPM8<sup>226</sup>.

Además de sobre los canales iónicos TRP, el CBDA es capaz de bloquear los receptores cannabinoides GPR55<sup>338</sup> y activar los receptores PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ <sup>368</sup>. Debido a que esta molécula contiene un resto de ácido acetil salicílico en su estructura, es capaz de bloquear la acción de las enzimas COX-1 y COX-2<sup>134,369</sup>. A nivel enzimático, este compuesto es capaz de modular la actividad de enzimas tanto de síntesis como de degradación de EC, además de transportadores de recaptura de AEA, modulando así el tono endocannabinoide en el organismo<sup>226</sup>. Así, se ha descrito la capacidad del CBDA de inhibir la enzima NAAA, responsable del catabolismo de PEA, así como la enzima DAGL $\alpha$  responsable de la síntesis de 2-AG,. Además, se ha detectado su acción sobre las enzimas de degradación FAAH y MAGL, aunque en este caso a altas concentraciones del compuesto y con una eficacia muy baja<sup>226</sup>. Por último, el CBDA es capaz de modular la activación de los receptores 5-HT $_{1A}$  con mayor potencia que el CBD<sup>370</sup>.

El CBDA ha demostrado su eficacia frente a diversas afecciones gracias a su capacidad multidiana. Entre otras dolencias, se investiga la aplicación del CBDA para el tratamiento del dolor inflamatorio, las náuseas, crisis convulsivas y epilepsia, y su potencial frente al cáncer, siendo en ocasiones más potente que el CBD<sup>370–373</sup>. Una de las posibles ventajas del CBDA como potencial principio activo es su buena farmacocinética, ya que alcanza concentraciones máximas en sangre más de 15 veces superiores al CBD<sup>374</sup>. Por el contrario, presenta ciertas dificultades de manejo experimental, debido a su relativamente baja estabilidad cuando es formulado.

### (E)- $\beta$ -Cariofileno

Dentro de los constituyentes del cannabis, encontramos algunos no exclusivos de la planta, con una estructura química ligeramente diferente y por lo tanto no considerados fitocannabinoides, pero que sin embargo presentan cierta actividad cannabinoide. Este es el caso del (E)-BCP. El (E)-BCP es un componente de los aceites esenciales de gran variedad de



plantas aromáticas, presente en formulaciones farmacológicas como el Sativex®<sup>375</sup>. En el caso de la planta *Cannabis sativa*, representa el 35% de la composición de estos aceites esenciales<sup>134,376,377</sup>. Se encuentra en la planta junto con su isómero (Z)-BCP, el  $\alpha$ -humuleno y el óxido de (E)-BCP, aunque estos en menor proporción. Ambos isómeros de BCP tienen afinidad por el receptor CB<sub>2</sub>, aunque el isómero (E)-BCP con mucha más afinidad<sup>377,378</sup>, comportándose como agonista de este receptor<sup>377</sup>. Además, este compuesto es capaz de activar los receptores PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ <sup>379</sup>, actúa a través de la activación de los receptores TLR y  $\mu$ -Opioides y presenta actividad antagonista de los receptores  $\alpha$ 7-nicotínicos de acetilcolina. Por otro lado, tiene la capacidad de inhibir la LOX<sub>s</sub>, enzima que participa en la generación de mediadores inflamatorios de la vía de metabolismo del 2-AG<sup>378</sup>.

También se ha descrito su papel como lavador de radicales libres (*scavenger activity*), su capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, su capacidad para restaurar el ciclo glutathione red/ox, por lo que se le han atribuido propiedades neuroprotectoras contra daño en el ADN, oxidación protéica y peroxidación mitocondrial<sup>380</sup>.

Además de sus propiedades antioxidantes, numerosos trabajos han descrito la potente actividad antiinflamatoria del (E)-BCP, reduciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias derivada de la estimulación con la toxina LPS, el edema inflamatorio inducido por carragenato o produciendo una inmunomodulación inhibiendo la respuesta de las células T del sistema inmune<sup>134,377,381–383</sup>. Por todo ello, el (E)-BCP presenta actividad neuroprotectora, ansiolítica, analgésica y antioxidante<sup>376,381,383,384</sup>.

Debido a su actividad pleotrópica y a sus características farmacocinéticas (buena farmacocinética oral y alta permeabilidad por la BHE y la barrera placentaria)<sup>376,378</sup>, unidas a su alto perfil de bioseguridad (descrito como no citotóxico ni genotóxico y aprobado por la Administración de Medicamentos y alimentos de EE.UU (FDA) como aditivo alimenticio) este compuesto se posiciona como un excelente agente terapéutico.

| Compuestos                          | Potencial terapéutico |              |                |                                  |
|-------------------------------------|-----------------------|--------------|----------------|----------------------------------|
|                                     | Antiinflamatorio      | Antioxidante | Neuroprotector | Modulación tono endocannabinoide |
| $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol    | ✓                     | ✓            | ✓              | ✓                                |
| $\Delta^9$ -tetrahidrocannabivarina | ✓                     | ✓            | ✓              | ✓                                |
| Cannabidiol                         | ✓                     | ✓            | ✓              | ✓                                |
| Cannabidivarina                     | ✓                     |              |                | ✓                                |
| Ácido cannabidiólico                | ✓                     | ✓            |                | ✓                                |
| (E)- $\beta$ -Cariofileno           | ✓                     | ✓            | ✓              |                                  |

Tabla 3. Potencial terapéutico de los derivados botánicos del *C. sativa* para su aplicación en la ELA.

## El SEC y la modulación de procesos fisiológicos

Como ya mencionamos anteriormente, el SEC tiene esencialmente un papel modulador en el organismo, participando activamente en la regulación de la homeostasis celular. Debido a su amplia distribución, ejerce su papel regulador en multitud de sistemas fisiológicos, desde procesos de desarrollo, hasta su papel en la supervivencia celular, rol muy relevante en el desarrollo tumoral en el cáncer<sup>385–388</sup>. Se ha identificado la contribución reguladora del SEC en SN<sup>389–392</sup>, Sistema inmune, Sistema gastrointestinal<sup>393,394</sup>, Sistema reproductivo<sup>395,396</sup>, Sistema endocrino<sup>397–399</sup>, Sistema óseo y muscular<sup>400</sup>, Sistema respiratorio y Sistema vascular<sup>401</sup>. En la **Tabla 4** podemos encontrar las principales aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides en condiciones patológicas, en ocasiones basadas en la posible desregulación del SEC en los diferentes tejidos.

A nivel del SN, el SEC tiene un papel fundamental durante el neurodesarrollo y en la modulación de la transmisión nerviosa. El SEC regula programas de especificación celular y la migración neuronal, participando activamente en la adquisición de las características morfológicas, fisiológicas y moleculares de las neuronas durante la diferenciación celular. Además, regula la maduración del sistema de neurotransmisión<sup>402–405</sup>. Por otro lado, el SEC también es capaz de modular la homeostasis energética gracias, entre otros, a la participación del receptor CB<sub>1</sub> de las mitocondrias<sup>168,406</sup>. Otra de las funciones importantes que lleva a cabo el SEC es la regulación del tono arterial cerebral mediante la activación de CB<sub>1</sub> en músculo liso y astrocitos, ya que modula la liberación de NO<sup>52</sup>.

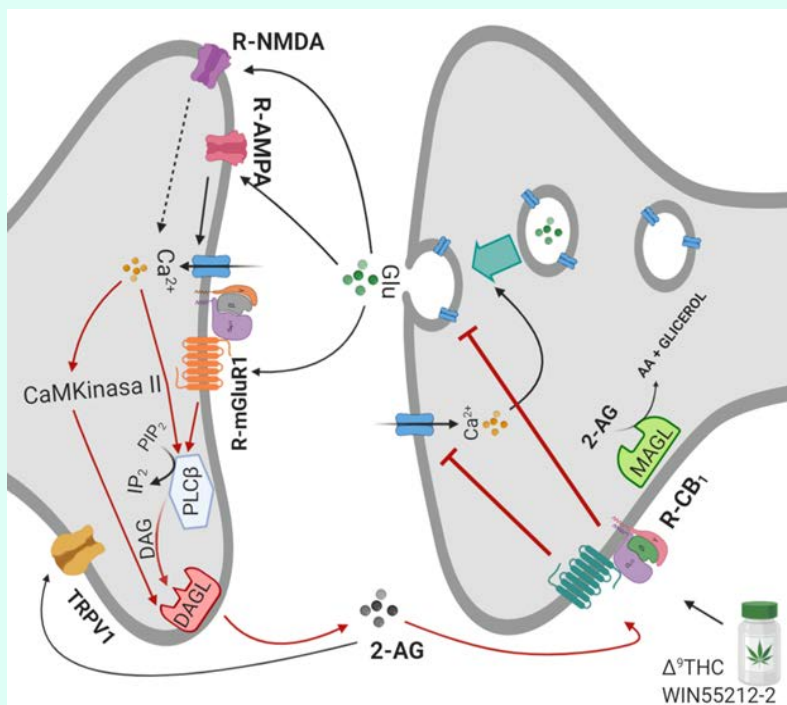
Una de las propiedades más importantes del SEC en el sistema nervioso es la capacidad del SEC de modular de la transmisión nerviosa (**Cuadro 10**). Este proceso afecta de manera directa a numerosos procesos biológicos controlados por el cerebro. El SEC actúa principalmente como un sistema de señalización retrógrado. Los receptores del SEC se expresan en las principales neuronas excitatorias e inhibitorias a nivel presináptico, regulando la frecuencia de disparo y la liberación de NTs de estas neuronas. Sin embargo, la maquinaria de síntesis de los ligandos endógenos del sistema se localiza a nivel postsináptico. Cuando se produce una despolarización en la membrana postsináptica, a consecuencia de una entrada masiva de calcio, se produce la estimulación de la síntesis de endocannabinoides en la neurona postsináptica, que posteriormente difunden a la brecha sináptica para actuar sobre los receptores cannabinoides localizados a nivel presináptico. De este modo, el SEC ejerce un control sobre la actividad nerviosa, tanto excitatoria como inhibitoria. En ocasiones, sin embargo, el SEC puede ejercer su modulación nerviosa de manera no retrógrada, actuando sobre receptores localizados en la célula postsináptica y de manera autocrina<sup>407,408</sup>.

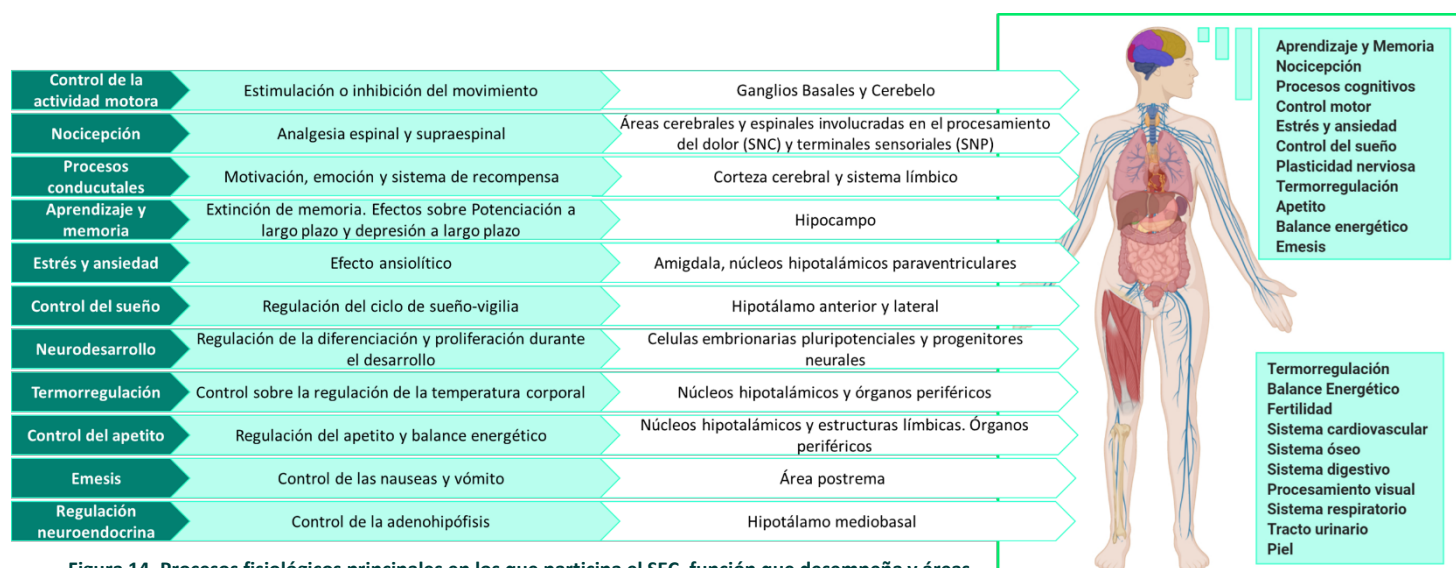
### Cuadro 10. SEC Y SU IMPLICACIÓN EN LA MODULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN NERVIOSA

Gracias al estudio con ciertos cannabinoides sintéticos y derivados de la planta se han podido establecer las bases de la modulación que ejerce el SEC sobre la transmisión sináptica. Concretamente, los fitocannabinoides más conocidos con este efecto son el  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCV y CBN. El fitocannabinoide más estudiado en esta modulación ha sido el  $\Delta^9$ -THC, y se ha observado su efecto a la transmisión GABAérgica, colinérgica, glutamatérgica y noradrenérgica, además de modular la acción del ATP a nivel periférico<sup>134</sup>. Por otro lado, se ha observado la inhibición de la transmisión glutamatérgica del CBD a nivel central, una acción dependiente del receptor CB<sub>1</sub><sup>347</sup>. A nivel periférico, el CBD es capaz de antagonizar los efectos de ciertos cannabinoides sintéticos como es el WIN 55212-2, sin embargo, esta acción parece independiente de los receptores cannabinoides clásicos<sup>702</sup>. Por último, se ha descrito la capacidad de este fitocannabinoide para modular la transmisión sináptica por medio de su antagonismo sobre el receptor GPR55<sup>213</sup>. El  $\Delta^9$ -THCV ejerce una modulación sináptica de la neurotransmisión GABAérgica ejerciendo su acción antagonista o agonista inverso sobre el receptor CB<sub>1</sub>.

En general, estos efectos se atribuyen a su interacción con los receptores cannabinoides. En el caso de CB<sub>1</sub>, se ha visto su implicación en la inhibición de la transmisión sináptica de los NTs GABA, Glutamato, acetilcolina y noradrenalina. Este receptor se sitúa en el terminal presináptico por lo que, tras su activación, se produce una inhibición de la liberación de NTs por parte de la neurona presináptica. Generalmente esto se produce por la inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje de la membrana presináptica, aunque también se puede producir la inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup> de las vesículas transportadoras de NTs. También se han visto evidencias de la implicación de los canales de K<sup>+</sup><sup>134</sup>. El caso del receptor CB<sub>2</sub>, también existen evidencias de que ejerce este tipo de modulación fisiológica<sup>407</sup>. Por ejemplo, la activación del receptor por el ligando endógeno 2-AG es capaz de bloquear la emesis producida por el tratamiento con morfínicos<sup>703</sup>. Otro ejemplo es cómo la activación de este receptor en neuronas dopaminérgicas de áreas mesolímbicas provoca su inhibición e interfiere con las vías de recompensa de la cocaína<sup>188</sup>. En esta línea, algunos trabajos *in vitro* han permitido describir un proceso de inhibición similar al del receptor CB<sub>1</sub><sup>177</sup>.

**Esquema de la modulación de la transmisión sináptica por la señalización cannabinoide** (endógena: 2-AG y exógena:  $\Delta^9$ -THC y WIN55212-2). La neurona presináptica libera glutamato a la brecha sináptica, activando los receptores AMPA, NMDA y mGluR1 de la neurona postsináptica. Esto desencadena la despolarización de la neurona postsináptica y como consecuencia la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje, lo que, sumado a la apertura de los canales iónicos NMDA, provocan la entrada masiva de calcio a la neurona postsináptica. Este incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular induce a la producción de 2-AG, que es liberado a la brecha sináptica, donde difunde de manera retrógrada hasta activar el receptor CB<sub>1</sub> presente en el terminal axónico presináptico. El receptor CB<sub>1</sub> activado inhibe los canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes, ejerciendo una inhibición directa de la liberación del neurotransmisor. Por otro lado, la activación del receptor mGluR1 induce la síntesis de 2-AG. El receptor CB<sub>1</sub> también puede ser activado por moléculas exógenas, como es el caso de los cannabinoides sintéticos o los fitocannabinoides. Modificado de R. Pertwee. *Handbook of cannabis* 2014 y Kind et al 2019





**Figura 14. Procesos fisiológicos principales en los que participa el SEC, función que desempeña y áreas involucradas en SNC. Participación del SEC en otros procesos en los principales sistemas del organismo.**

Además de sobre las neuronas, el papel neuromodulador del SEC ocurre en otros sustratos celulares. A pesar de que el papel del astrocito en la regulación de la plasticidad sináptica ha sido ampliamente estudiado a lo largo de los años<sup>409-412</sup>, no ha sido hasta muy posteriormente que se ha implicado en este proceso de regulación al SEC.

Otra de las funciones que se le atribuyen al receptor CB<sub>1</sub> astrocitario es la regulación del aporte energético de glucosa a neuronas, ya que incrementan la tasa de oxidación de glucosa y la de utilización de cuerpos cetónicos<sup>413</sup>. Como ya comentamos anteriormente, clásicamente se establecía el papel de la glía como células de soporte de las neuronas, esenciales para el aclaramiento en la brecha sináptica de iones (K<sup>+</sup>) y NTs (Glutamato). De hecho, se estima que en torno al 90% del glutamato retirado de la brecha sináptica se debe a la acción de los receptores GLT-1 y GLAST de los astrocitos<sup>163</sup>. Sin embargo, estudios posteriores han mostrado que su papel en la transmisión nerviosa no se limita a mantener la homeostasis de la brecha sináptica, y se han identificado los receptores CB<sub>1</sub> de astrocitos como elementos clave en la regulación de procesos cognitivos<sup>411</sup>. Los receptores CB<sub>1</sub> presentes en los astrocitos responden de manera directa a la liberación de ECs por parte de las neuronas, y como consecuencia de esta activación se produce una liberación de gliotransmisores dependiente de Ca<sup>2+</sup>, incluido el glutamato. Este glutamato actúa sobre los receptores NMDA de la neurona presináptica adyacente, facilitando la plasticidad sináptica a largo plazo<sup>164</sup>. Este proceso pone de manifiesto una vía de comunicación Astrocito-Neurona, dependiente de endocannabinoides.

Por lo tanto, el SEC tiene un papel relevante en la regulación de la transmisión nerviosa. Por un lado, gracias a la señalización retrógrada, disminuye el input de las sinapsis principales, modulando la fuerza de la señalización sináptica. De manera secundaria, mediante la participación del astrocito, se produce una modulación de otras sinapsis laterales, consiguiendo una homogeneidad en la fuerza sináptica, lo cual tiene especial relevancia en ciertas áreas cerebrales para la coordinación de la actividad nerviosa<sup>411</sup>. Este efecto dual depende de las vías de señalización intracelular que se activen, ya que en el caso de los astrocitos los receptores CB<sub>1</sub> pueden estar acoplados a proteínas G<sub>q/11</sub>, mientras que en neuronas se acopla mayoritariamente a G<sub>i/o</sub>. Además, mientras que el efecto directo de la señalización endocannabinoide requiere proximidad, la señalización de los astrocitos puede extenderse intra e intercelularmente, teniendo un gran alcance

neuromodulador, lo que lleva a la potenciación lateral de sinapsis muy distantes a la zona de liberación de endocannabinoides<sup>411,414,415</sup>.

Recientemente, también se ha identificado un papel modulador de la sinapsis de las células de la microglía<sup>416-420</sup>, y ciertos autores relacionan la liberación de endocannabinoides por parte de la microglía como potencial impacto sobre la plasticidad sináptica<sup>409,421,422</sup>.

Debido a la amplia distribución del receptor CB<sub>1</sub> a lo largo del SNC, muchos de los procesos controlados por el SEC están mediados por la activación de este receptor. Entre los procesos fisiológicos más importantes se incluyen el control de la actividad motora, termorregulación, control de la ingesta, modulación de los ciclos de sueño-vigilia y regulación de la emesis. Además, mediante su papel en la plasticidad sináptica, este sistema participa en la modulación de procesos cognitivos y de memoria y aprendizaje, además de estar involucrado en procesos de diferenciación celular y supervivencia neuronal<sup>423,424</sup>.

| Condición patológica                        | Aplicación   |
|---|--|
| <b>Nausea y vómito</b>                      | Frente la emesis inducida por toxinas, como la quimioterapia <sup>192,193</sup> . Los ECs AEA y 2-AG así como los fitocannabinoides $\Delta^9$ -THCA, $\Delta^9$ -THC, $\Delta^9$ -THCV, CBDV, CBD, CBDA <sup>194-199</sup> tienen un papel modulador de la emesis.  |
| <b>Dolor</b>                                | Tratamiento de dolor crónico y dolor neuropático. Los fitocannabinoides $\Delta^9$ -THC, $\Delta^9$ -THCV, CBD y CBG <sup>2,200,201</sup> , solos o en combinación, modulan trastornos del dolor de tipo inflamatorio y neuropático (Esclerosis Múltiple, lesiones medulares, neuropatía diabética o fibromialgia <sup>202-205</sup> ), como alternativa a los opioides <sup>206</sup> .   |
| <b>Trastornos psiquiátricos</b>             | Tratamiento en trastornos como la ansiedad y el estrés postraumático <sup>207,208</sup> . Se ha investigado la modulación del tono endocannabinoide para este fin <sup>162</sup> . Por otro lado, una disfunción en el SEC parece estar implicada en la fisiopatología de enfermedades como la esquizofrenia. Se ha propuesto el uso del CBD por sus propiedades ansiolíticas independientes de la activación de los receptores CB <sub>1</sub> y CB <sub>2</sub> <sup>209</sup> y antipsicóticas, actuando a diferentes niveles en el SEC <sup>210</sup> .  |
| <b>Cáncer</b>                               | Inhibición de la migración celular y vías de supervivencia celular en ciertos tipos de cáncer <sup>211-217</sup> . El SEC se encuentra alterado en tejidos tumorales, mostrando un potencial papel regulador en esta patología <sup>99</sup> .   |
| <b>Adicción</b>                             | Modulación del llamado sistema de recompensa <sup>2</sup> . El bloqueo farmacológico de los receptores CB <sub>1</sub> <sup>218</sup> , así como la activación del receptor CB <sub>2</sub> <sup>51,219</sup> como potencial estrategia para el tratamiento de la adicción. Se proponen los cannabinoides como tratamientos coadyuvantes en trastornos de abuso del alcohol o los opioides <sup>220-222</sup> .  |
| <b>Desórdenes metabólicos</b>               | $\Delta^9$ -THCV o CBD para el tratamiento de la Diabetes <sup>223</sup> . Además, se ha propuesto la modulación del SEC para otros trastornos metabólicos como la obesidad <sup>224</sup> . Además, en SNC, el SEC modula las propiedades de recompensa de los alimentos actuando en zonas mesolímbicas específicas (en el hipotálamo, los receptores CB <sub>1</sub> y los ECs son regulan el apetito y la ingesta) <sup>226</sup> .   |
| <b>Enfermedades neonatales e infantiles</b> | Uso de cannabinoides para el tratamiento de encefalopatías hipóxico-isquémicas neonatales y accidentes cerebrovasculares arteriales de tipo isquémico en el recién nacido <sup>227,228</sup> . Además, se ha propuesto el uso de CBD en otros tipos de enfermedades infantiles como la epilepsia refractaria <sup>229</sup> .  |
| <b>De otros sistemas</b>                    | Además, estudios preclínicos han demostrado la implicación del SEC en diversas patologías asociadas a los múltiples sistemas de nuestro organismo, como es el sistema vascular <sup>116</sup> , a nivel gastrointestinal <sup>230</sup> , sobre el tracto urinario <sup>231</sup> , en enfermedades respiratorias <sup>232</sup> , enfermedades de la retina <sup>233,234</sup> , sistema reproductor <sup>235</sup> , sistema óseo <sup>236</sup> , daño muscular <sup>237</sup> , trastorno del sueño <sup>2</sup> , enfermedades autoinmunes <sup>238</sup> , patologías relacionadas con la piel <sup>239-241</sup> , etc. |

**Tabla 4. Aplicación de cannabinoides en el tratamiento de enfermedades.**

## El SEC y neuroprotección. Énfasis en las enfermedades Neurodegenerativas

Como ya mencionamos anteriormente, la principal función del SEC en el SNC es la modulación de la excitabilidad neuronal mediante la regulación de la transmisión sináptica por señalización retrógrada. La retroalimentación negativa que ejerce este sistema, conocido como plasticidad a corto plazo, es muy efectiva para limitar el exceso de estimulación neuronal en la sinapsis. De este modo, el SEC es un sistema de **protección a demanda frente a la excitotoxicidad aguda**<sup>425</sup>. Debido a que el SEC está ampliamente distribuido a lo largo del SNC, puede ejercer un papel compensatorio cuando se producen alteraciones patológicas, con el objetivo de preservar la supervivencia neuronal<sup>426,427</sup>. Asimismo, su desregulación podría tener consecuencias neuropatológicas, que dependerán de su localización y la naturaleza de la vía que regula<sup>428</sup>.

Por otro lado, los cannabinoides regulan de la integridad y supervivencia celular, participando en la decisión de destino celular. Mediante la activación de ciertas vías de señalización, como por ejemplo la vía PI3K/Akt, los receptores CB<sub>1</sub> inducen efectos protectores en la supervivencia celular<sup>429,430</sup>. Esta función es especialmente relevante en SN, ya que las neuronas tienen una capacidad de remplazo muy limitada. La participación del SEC en el mantenimiento e integridad celular en el SNC es el resultado de una serie de efectos dirigidos a preservar, rescatar, reparar y reemplazar las células nerviosas dañadas. Por lo tanto el SEC ejerce un papel neuroprotector bajo ciertas condiciones patológicas, como las END<sup>52,431</sup>.

Las END son un conjunto de afecciones crónicas debilitantes e incapacitantes que tienen como característica principal la degeneración progresiva del tejido nervioso de manera focalizada, incluidas determinadas subpoblaciones neuronales en regiones específicas del SNC. Esto provoca un deterioro progresivo de las zonas afectadas, y como consecuencia, la sintomatología que las acompaña. A pesar de que no existe un mecanismo patogénico principal por el que se producen estas enfermedades, todas comparten una serie de eventos fisiopatológicos implicados en la aparición de los daños celulares. Así, entre otras alteraciones patológicas, encontramos neuroinflamación, EO, excitotoxicidad, alteración en la homeostasis del calcio, disfunción mitocondrial, alteración en la homeostasis proteica y en ocasiones alteración en los procesos de autofagia<sup>432</sup>. Estas alteraciones patológicas son características de las END y aparecen de manera conjunta durante el proceso de neurodegeneración, pudiendo ser una causa de la aparición de otras<sup>52</sup>. Diferentes elementos del SEC participan activamente en estos procesos patológicos, ya sea participando en los procesos de neurodegeneración o con un papel neuroprotector<sup>52,403,433</sup>. Esto hace que la modulación del SEC se presente como una herramienta altamente versátil para combatir los síntomas y sobre todo el progreso de la enfermedad. Los compuestos cannabinoides presentan un perfil farmacológico de amplio espectro, algo muy interesante a la hora de hacer frente a enfermedades de origen multifactorial, como es el

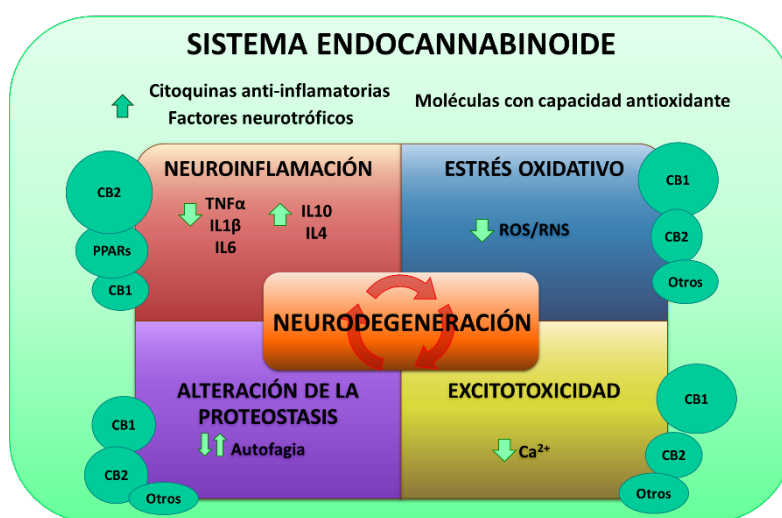


Figura 15. Principales efectos neuroprotectores del Sistema Cannabinoide Endógeno.

caso de las END<sup>434,435</sup>. En este apartado vamos a centrarnos en las propiedades neuroprotectoras de los cannabinoides en los eventos patológicos que se dan con mayor frecuencia en la ELA.

### Cannabinoides frente a la excitotoxicidad

En las END se produce una desregulación en el control de la transmisión glutamatérgica y GABAérgica que podría ser contrarrestada activando el SEC. La activación excesiva de los receptores de glutamato por aminoácidos excitatorios conlleva a una serie de consecuencias deletéreas que incluyen alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , generación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, aumento de la permeabilidad mitocondrial y excitotoxicidad secundaria<sup>436</sup>. Por lo tanto, la modulación del SEC y más concretamente la activación de los receptores  $\text{CB}_1$ , podría presentar alto valor terapéutico frente a los procesos de excitotoxicidad derivada de las alteraciones en la homeostasis de glutamato por dos razones. Primero, gracias a la capacidad de los receptores  $\text{CB}_1$  de reducir la liberación de ciertos NTs a nivel presináptico, y por otro lado, mediante la activación de los receptores  $\text{CB}_1$  postsinápticos, regulando el exceso de excitabilidad en la neurona postsináptica<sup>67</sup>.

### El SEC frente al estrés oxidativo

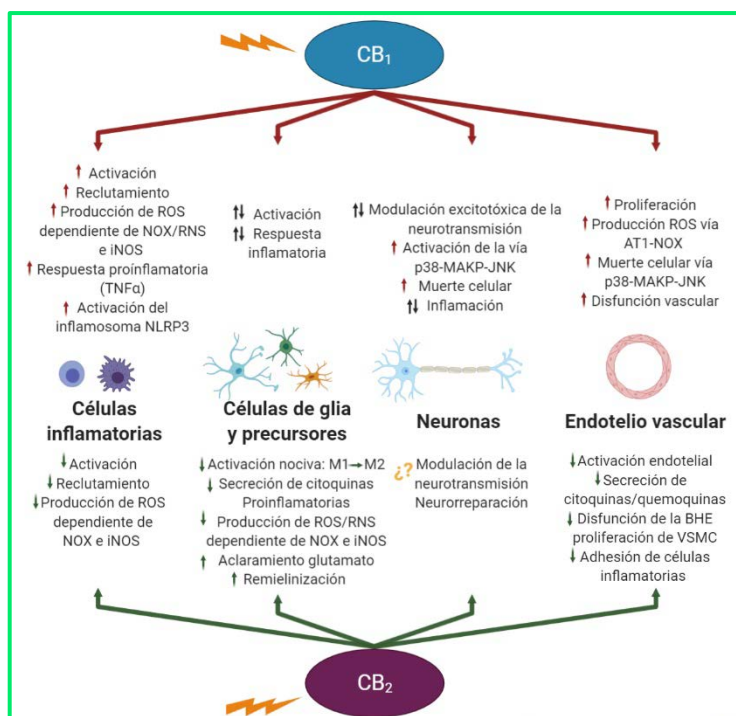
En un sistema biológico, el desequilibrio entre moléculas con capacidad oxidante y moléculas antioxidantes producen lo que conocemos como EO. Esto puede deberse a un exceso de ROS, o un defecto en los sistemas antioxidantes<sup>437</sup>. En las END, el EO está implicado en la propagación de la lesión neuronal y consecuente respuesta inflamatoria, lo que desencadena otras alteraciones patológicas características. A pesar de que el daño tisular debido a la sobreproducción de ROS/RNS es un proceso patológico clave en las neurodegenerativas, todavía no se ha establecido si se trata de una causa primaria o consecuencia del deterioro celular en cada tipo de END.

La primera observación acerca del potencial neuroprotector de los cannabinoides se basó en que ciertos cannabinoides presentan actividad de secuestradores de radicales libres debido a su estructura química, lo que los convierte en potentes moléculas antioxidantes<sup>438</sup>. Además, el SEC interacciona con diferentes vías de señalización dependientes de redox. Por un lado, en macrófagos, tras un incremento de los niveles de radicales libres debido a la activación de la NADPH oxidasa, se produce la activación de la DAGL $\beta$ , con el consiguiente aumento de 2-AG<sup>439</sup>. Además, se ha visto que la inhibición del receptor  $\text{CB}_1$  produce una reducción del EO derivado de la activación del receptor tipo 1 de angiotensina II<sup>440</sup>. Por otro lado, se ha visto que la activación del receptor  $\text{CB}_2$  disminuye la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS/NOS2) mediante la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 durante procesos inflamatorios en el SNC, lo que reduce la activación patológica de las células de microglía<sup>441</sup>. Por último, ciertas enzimas antioxidantes son moduladas por los ligandos cannabinoides endógenos, no solo actuando a través de los receptores clásicos, sino mediante la modulación de otros como TRPV1, PPAR $\alpha$ , GPR18, GPR19 y GPR55<sup>427,442,443</sup>. Por lo tanto, la modulación directa y/o indirecta de las vías a través de las cuales los endocannabinoides amortiguan el EO puede representar una estrategia prometedora para reducir el daño causado por un desequilibrio redox<sup>442,444</sup>. De hecho, se han utilizado los cannabinoides como herramienta farmacológica para diferentes enfermedades que cursan con este proceso patológico<sup>444–447</sup>.



## Papel del SEC en la neuroinflamación

La neuroinflamación es un evento secundario al daño cerebral. En respuesta a una lesión o una infección, la glía activada, principalmente astrocitos y microglía, puede funcionar como mecanismo protector, participando en la reparación y los procesos de lucha frente a la infección para restaurar la homeostasis normal del tejido afectado. Sin embargo, si este proceso se cronifica, puede conducir a mayor daño tisular. Diversos trabajos han observado una desregulación del SEC como consecuencia de los procesos neuroinflamatorios, lo que pone de manifiesto su potencial como diana farmacológica<sup>427,448-452</sup>.



**Figura 16. Principales efectos neuroprotectores derivados de la activación de los receptores CB<sub>2</sub>.** Adaptado de Paloczi et al. 2018

Debido a la activación microglial, se produce un aumento de la liberación de citoquinas proinflamatorias que estimulan enzimas inflamatorias como la COX-2. La enzima COX-2, además de generar prostaglandinas y aumentar la liberación de ROS, tiene efectos indirectos sobre la degradación de la AEA y el 2-AG, por lo que su sobreproducción reduce el tono endocannabinoide, y con él, su potencial inmunomodulador. Se ha observado en algunos modelos experimentales que la inhibición de la enzima COX-2 puede ser altamente beneficiosa en esta enfermedad<sup>67,453</sup>.

Se han propuesto diversas estrategias farmacológicas basadas en la modulación del SEC para combatir los efectos de la neuroinflamación. Por un lado, se ha visto que bloquear la desactivación de los endocannabinoides, es decir, aumentar su disponibilidad y alargar en el tiempo su efecto, tiene efectos sobre la activación de la microglía, promoviendo su fenotipo antiinflamatorio y reduciendo la neurodegeneración en un modelo de trauma cerebral<sup>454</sup>. La AEA está involucrada en procesos de apoptosis, disminuyendo la proliferación linfocitaria<sup>455</sup>. Las células de microglía son las principales productoras de endocannabinoides en respuesta a un estímulo inflamatorio. Este incremento de la liberación es inducido por la activación de los receptores purinérgicos ionotrópicos presentes en estas células. Este proceso es muy relevante a nivel terapéutico, ya que se ha relacionado la producción prolongada de 2-AG con los procesos de neuroinflamación<sup>456</sup>. Además, El 2-AG parece tener un papel determinante en la migración de la microglía hacia la zona de lesión durante el daño inflamatorio<sup>457</sup>.

Los receptores endocannabinoides juegan un papel en la inmunomodulación e inflamación. El receptor CB<sub>1</sub> inhibe la liberación de factores proinflamatorios como NO y TNFα en fases agudas de daño inflamatorio<sup>458</sup>. Además, la activación del receptor CB<sub>1</sub> reduce la liberación de factores pro inflamatorios como IL1β y TNFα en un modelo de enfermedad de Parkinson<sup>459</sup>. Sin embargo, el receptor CB<sub>1</sub> también es capaz de promover y facilitar la activación de las células de glía tras un estímulo inflamatorio, promoviendo la liberación de citoquinas proinflamatorias y favoreciendo el reclutamiento de



células inflamatorias<sup>52</sup>. Sin embargo, en los procesos neuroinflamatorios principalmente está involucrado el receptor CB<sub>2</sub>. De hecho, de manera generalizada, los procesos de neuroinflamación asociada a END vienen acompañados de un aumento de la expresión del receptor CB<sub>2</sub>, principalmente en las células de microglía<sup>184,460</sup>. Es por esto por lo que se ha sugerido que la mayoría de los efectos antiinflamatorios derivados de la activación del SEC son mediados por este receptor. En este sentido, se ha comprobado que la activación del receptor CB<sub>2</sub> reduce la activación de la microglía, por lo que reduce la liberación de citoquinas proinflamatorias, lo que limita la propagación de la respuesta inflamatoria<sup>433,461,462</sup>. Además, el receptor CB<sub>2</sub> se localiza en los lamelipodios de las células de microglía, participando activamente en los procesos de migración celular<sup>89</sup>. Por lo tanto, el receptor CB<sub>2</sub> es una excelente diana contra la inflamación, ya que su activación disminuye la propagación de la respuesta inflamatoria al reducir la activación glial.

La activación selectiva del receptor CB<sub>2</sub> modifica el estado de activación de los macrófagos y previene la producción de citoquinas proinflamatorias, modificando el ratio de polarización M1/M2 hacia el estado de activación protector M2<sup>463-466</sup>. Esta polarización de la activación microglial no solo supone un efecto beneficioso por la disminución de citoquinas proinflamatorias, sino que con el incremento de la población M2 se promueve la liberación de factores anti inflamatorios y mediadores pro supervivencia celular, como la IL10 o el TGF- $\beta$ <sup>460,467</sup>. Además, Mecha y colaboradores observaron que en presencia de los ligandos cannabinoides endógenos la microglía es capaz de adquirir diferentes fenotipo protectores M2<sup>466</sup>.

Además de los receptores clásicos, otros ligandos relacionados con el SEC están involucrados en la modulación de los procesos neuroinflamatorios. La N-araquidonoil-glicina (NAGly) modula la activación de la microglía a través de la activación del receptor GPR18. La toxina LPS provoca la sobreexpresión de los receptores GPR18. Esto hace que los macrófagos con fenotipo M1 presenten una sobreexpresión de este receptor frente a los M2, y el tratamiento con NAGly reduce su viabilidad en un 40%, frente a un 10% en el caso de los de fenotipo M2<sup>468</sup>. Por otro lado, el antagonismo del receptor GPR55 disminuye la liberación de prostaglandinas por parte de la microglía<sup>469</sup>. Por último, los cannabinoides también pueden ejercer su efecto antiinflamatorio también a través de la activación de los receptores PPAR<sup>470-472</sup>. Además, los cannabinoides podrían ser útiles en la modulación del receptor purinérgico P2X<sub>7</sub>, altamente relacionado con los procesos inflamatorios ya que es responsable, entre otras funciones, de la liberación del mediador inflamatorio IL1 $\beta$ . Además, este receptor regula la síntesis y degradación de endocannabinoides en las células de microglía<sup>456</sup>. Las células de microglía utilizan estos receptores como sensores de daño cerebral, ya que son muy sensibles al ATP liberado por astrocitos y células lisadas<sup>456</sup>. La activación de estos receptores provoca cambios en el fenotipo de la microglía, que sufren cambios morfológicos y aumentan su tasa de migración<sup>80,473</sup>. Además, liberan citoquinas para orquestar la respuesta inflamatoria<sup>456</sup>. De hecho, se ha relacionado la activación de este receptor con el fenotipo proinflamatorio de la microglía, ya que altera la expresión de la vía IL6/STAT3, responsable de controlar la liberación de TNF $\alpha$ <sup>474</sup>. Efectos similares se han encontrado en los astrocitos, en los que la sobreactivación de este receptor inicia su fenotipo tóxico e incrementa el EO<sup>91</sup>

### Potencial neuroprotector del SEC como modulador de la autofagia

Los agregados celulares de proteínas mal plegadas son otro sello característico de la patogénesis en la mayoría de las END. La aparición de estas inclusiones de proteínas tiene diferentes causas, ya que pueden deberse a mutaciones genéticas, por ejemplo, ciertas mutaciones en el gen TARDBP incrementan la tendencia de la proteína TDP43 a agregar; o a otros

mecanismos que llevan a alteraciones en la proteostasis, lo que contribuye a la agregación de las proteínas<sup>33,96</sup>. Como consecuencia, se producen acúmulos de proteínas en los diferentes entornos celulares (espacio intra y extracelular) y compartimentos subcelulares (citoplasma, núcleo, etc.). Este evento atribuye a muchas de estas enfermedades la denominación de proteinopatías<sup>96,97</sup>.

Se han observado defectos en las vías de autofagia en numerosas END<sup>100,475-477</sup>. Por otro lado, existen evidencias que relacionan los procesos de autofagia con el SEC<sup>478</sup>. Diversos autores han utilizado como estrategia farmacológica la activación del SEC con la finalidad de modular los procesos de autofagia en diferentes enfermedades, con resultados prometedores<sup>479-483</sup>. Al igual que en estas enfermedades, esta estrategia podría ser ventajosa en las END para la eliminación de los acúmulos proteicos, aunque este es tema requiere ser investigado en detalle. En cualquier caso, en el contexto de esta Tesis Doctoral, el uso de ligandos cannabinoides podría tener un papel beneficioso frente a los defectos en la autofagia que se producen en la ELA.

# Cannabinoides y ELA

La ELA es una enfermedad devastadora con un pronóstico desolador. A pesar de los esfuerzos de la investigación básica y clínica, actualmente no existe ningún tratamiento verdaderamente efectivo para frenar su progresión, y la presión por desarrollar una terapia farmacológica para esta enfermedad sigue siendo muy alta. En las últimas décadas, han surgido múltiples aproximaciones farmacológicas basadas en los diferentes eventos fisiopatológicos que cursan con esta enfermedad. Lamentablemente, prácticamente todas han fracasado en los ensayos clínicos, lo que ha generado cierto escepticismo entorno al desarrollo de una terapia efectiva (Tabla 5). Hasta 2015, el único medicamento designado para el tratamiento de la ELA era el Riluzol (RILUTEK®), cuyo mecanismo de acción se basaba en sus propiedades antiexcitotóxicas, ya que bloquea los canales de Na<sup>+</sup> en las MNs ejerciendo un efecto antiglutamatérgico<sup>484</sup>. Sin embargo, este fármaco presenta una ligera eficacia, que lamentablemente no ocurre en todos los pacientes, a la hora de aminorar la progresión de los síntomas. De hecho, su aplicación terapéutica ha estado rodeada de cierta controversia, ya que su efectividad en los ensayos clínicos no siempre es constante.

Aparte de esto, los tratamientos farmacológicos adicionales que se aplican en esta patología se centran en paliar la sintomatología que acompaña al declive físico y emocional de los pacientes. Los síntomas más típicos de la ELA son la debilidad muscular, las fasciculaciones y la espasticidad, que disminuye la destreza y precisión de los movimientos voluntarios. Además, gran cantidad de pacientes sufren dolor<sup>485</sup>. Muchos de estos síntomas se podrían atajar mediante la acción farmacológica de agonistas de los receptores cannabinoides, o mediante una modulación de la maquinaria metabólica del SEC que resulte de un aumento en los niveles de endocannabinoides<sup>93,486–488</sup>.

Como hemos visto a lo largo de esta introducción, la degeneración de las MNs en la ELA es altamente multifactorial, pudiendo producirse debido a procesos de desregulación de la homeostasis de glutamato, hiperactivación microglial, alteraciones en el procesamiento del ARN, disfunción en la proteostasis y los mecanismos de control de calidad de las proteínas, disfunción mitocondrial o defectos en las dinámicas de ensamblaje del citoesqueleto, lo que altera la actividad

| Mecanismo de acción principal           | Resultado del ensayo clínico                     |
|---|--|
| <b>Antiexcitotóxicos</b>                |  |
| Ceftriaxona                             | Fallido  |
| Talampanel                              | Fallido  |
| Memantina                               | Fallido  |
| Riluzol                                 | Mixto. Aprobado por primera vez 1995             |
| <b>Antioxidantes</b>                    |  |
| Coenzima Q10                            | Fallido  |
| Creatina                                | Fallido  |
| Edavarona                               | Aprobado en 2015 en Japón                        |
| <b>Antiinflamatorios</b>                |  |
| Celecoxib                               | Fallido  |
| Acetato de Glatiramero                  | Fallido  |
| Minociclina                             | Fallido  |
| Pioglitazona                            | Fallido  |
| Ácido valproico                         | Fallido  |
| Eritropoyetina                          | Fallido  |
| Masitinib                               | Aprobado con designación huérfana 2015           |
| <b>Acción mitocondrial</b>              |  |
| Olexosime                               | Fallido  |
| Dexpramipexol                           | Fallido  |
| <b>Factores neurotróficos</b>           |  |
| BDNF                                    | Fallido  |
| IGF-1                                   | Fallido  |
| CNTF                                    | Fallido  |
| <b>Estimuladores de la autofagia</b>    |  |
| Litio                                   | Fallido  |
| Rapamicina                              | Bajo investigación preclínica <sup>301,321</sup> |
| Trehalosa                               | Bajo investigación preclínica <sup>322,323</sup> |
| <b>Acción sobre músculo esquelético</b> |  |
| Tirasemiv                               | Fallido  |

**Tabla 5. Listado de compuestos testados en ensayos clínicos con potencial utilidad para el tratamiento de la ELA. Adaptado de Fernández-Ruiz 2019 y Petrov 2017.**

sináptica<sup>391,489</sup>. Esto pone de manifiesto la enorme complejidad que presenta la etiología de esta enfermedad, y podría ser, al menos en parte, la causa del fracaso en los esfuerzos por encontrar un tratamiento eficaz para combatirla<sup>434</sup>. La ELA es una patología multifactorial, con diferentes tipos celulares implicados en el desarrollo de su fisiopatología, por lo que una estrategia farmacológica multidiana podría conllevar mayores beneficios terapéuticos. En este sentido, los cannabinoides se presentan como oportunos candidatos para el tratamiento de esta patología. Como ya hemos mencionado, por su carácter pleiotrópico, los cannabinoides han mostrado ser excelentes agentes farmacológicos frente a las principales alteraciones que se producen en la ELA, por su capacidad de modular los procesos de autofagia, su eficacia frente a los procesos de EO, la regulación de los procesos inflamatorios y activación microglial mediante la modulación de los receptores cannabinoides, principalmente mediante la activación de CB<sub>2</sub>, y por el exquisito control que muestran en el exceso de excitabilidad neuronal, efecto principalmente mediado por la activación del receptor CB<sub>1</sub><sup>427,431,434</sup>.

### **Potencial de los Cannabinoides frente a la fisiopatología de la ELA**

Un fenómeno que posiciona la modulación del SEC dentro de las alternativas terapéuticas con mayor potencial es el hecho de que en la mayoría de estas enfermedades neurodegenerativas este sistema se encuentre alterado. Numerosos trabajos han encontrado alteraciones de diferentes elementos del SEC durante el desarrollo de la ELA, como por ejemplo aumento del tono endocannabinoide en la zona lumbar de la médula espinal (tanto AEA como 2-AG)<sup>184,490,491</sup> o la sobreactivación de la señalización mediada por el receptor CB<sub>1</sub>, lo que potencia su efecto sobre la modulación de la transmisión sináptica<sup>492,493</sup>. Por otro lado, se ha visto un incremento en la expresión de las enzimas de síntesis de endocannabinoides, como la NAPE-PLD<sup>494</sup>. Diversos autores han hipotetizado que este incremento del tono endocannabinoide puede ser un mecanismo de defensa protector, ya que la delección genética de la enzima de degradación FAAH produce un retraso en la progresión de la enfermedad. Además, este retraso en la progresión de la enfermedad también se produce con el tratamiento con el cannabinoide sintético WIN 55,212, agonista no selectivo de los receptores cannabinoides<sup>462,491</sup>. Además, mediante la utilización de un modelo animal de SOD1 que carecía del receptor CB<sub>1</sub>, se observó que la ablación genética de este receptor producía un incremento en la supervivencia de estos animales. Todos estos resultados parecen indicar que los efectos neuroprotectores que ejerce tanto el incremento de los niveles de AEA y 2AG como el tratamiento con WIN 55,212 son debidos principalmente a la activación del receptor CB<sub>2</sub>. Esto parece confirmarse con los hallazgos de diferentes investigadores que han observado una sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub> tanto en pacientes como en modelos experimentales<sup>89,126,184,189,461,494</sup>. Por lo tanto, la modulación farmacológica del SEC, concretamente del receptor CB<sub>2</sub> se presenta como una estrategia altamente prometedora como tratamiento para la ELA<sup>461,462</sup>.

### **El SEC en la regulación de la transmisión glutamatérgica**

Como ya comentamos anteriormente, la hiperexcitabilidad cortical y periférica es uno de los primeros marcadores patológicos que se han observado en los pacientes con ELA<sup>60,495</sup>. Una de las razones por las que ocurre este exceso de excitabilidad es la alteración de la homeostasis de glutamato extracelular<sup>453</sup>. Las MNs reciben muchas aferencias glutamatérgicas, por lo que una desregulación en la homeostasis del glutamato tiene un impacto especialmente importante en este tipo celular, y enorme contribución en la neurodegeneración que se produce en la ELA. Numerosos

estudios han encontrado alterado el metabolismo del glutamato en muestras de tejido de pacientes<sup>61,496</sup>, y la disfunción de los transportadores de glutamato<sup>62,497</sup> exagera los síntomas y la neurodegeneración. Además, se ha encontrado una actividad disfuncional del receptor mGlu5 en modelos experimentales de ELA<sup>60,497-499</sup>. Este receptor actúa como sensor de glutamato extracelular, en condiciones fisiológicas, también modula la liberación de endocannabinoides<sup>498,500</sup>, lo que ejerce mecanismo de control contra el exceso de excitabilidad. En modelos experimentales de ELA, a pesar de que este receptor está sobreexpresado, la comunicación receptor-transportadores no se produce, ya que la cascada de señalización de este receptor está alterada, por lo que no se producen las corrientes de calcio necesarias para activar los transportadores de recaptura<sup>499</sup>. La síntesis de endocannabinoides es un proceso dependiente de la actividad neuronal, por lo que, debido a la hiperexcitabilidad, se produce un aumento en la síntesis de endocannabinoides, y esto podría representar un mecanismo de defensa endógeno frente a estímulos excitotóxicos<sup>67</sup>. Por lo tanto, la modulación del SEC y más concretamente la activación de los receptores CB<sub>1</sub>, podría presentar alto valor terapéutico frente a los procesos de excitotoxicidad derivada de las alteraciones en la homeostasis de glutamato por dos razones. Primero, gracias a la capacidad del SEC de modular la liberación de NTs a nivel presináptico, y por otro lado, mediante la activación de los receptores CB<sub>1</sub> postsinápticos, regulando la excitabilidad de la neurona postsináptica y por lo tanto la propagación del potencial de acción<sup>67</sup>.

### Cannabinoides frente la neuroinflamación

Los procesos inflamatorios juegan un papel primordial durante el desarrollo de esta patología. Tanto en muestras de tejido *post-mortem* como en modelos animales se observa la presencia de células de glía activada<sup>81,184</sup>. En modelos experimentales, la presencia de microglía activada se observa desde periodos presintomáticos o tempranos, y se corresponde con la sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub><sup>89</sup>. De hecho, la localización mayoritaria del receptor CB<sub>2</sub> durante el desarrollo de la patología son las células de glía, principalmente la microglía<sup>89,184</sup>, aunque también se ha observado la sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub> en astrocitos<sup>126</sup>.

En el caso de la ELA, se ha observado una sobreexpresión en el receptor P2X<sub>7</sub> tanto en pacientes como en modelos experimentales<sup>89,501,502</sup>. Debido a que la activación de estos receptores estimula la síntesis e inhibe la degradación del 2-AG<sup>456,503</sup>, esta sobreexpresión puede ser, al menos en parte, responsable del incremento de los niveles de 2-AG observados en el transcurso de la patología. Como ya mencionamos anteriormente, este incremento en la producción de 2-AG podría entenderse como mecanismo compensatorio frente a la neurodegeneración, ya que el 2-AG liberado podría activar los receptores CB<sub>1</sub> de los vasos sanguíneos reduciendo el flujo cerebral y con esto la expansión del edema inflamatorio<sup>504</sup> y mediante la activación del receptor CB<sub>2</sub> reducir la activación microglial y con ello la liberación de citoquinas proinflamatorias, lo que reduciría la neuroinflamación<sup>462</sup>. Ciertos trabajos han relacionado el efecto antiinflamatorio de ciertos fitocannabinoides con la modulación de este receptor. Así, tanto el  $\Delta^9$ -THC como el CBD son capaces de reducir la respuesta inmunológica del receptor P2X<sub>7</sub>, y por lo tanto reducir los niveles de ciertas citoquinas proinflamatorias<sup>505,506</sup>. Mediante técnicas de modelización molecular se ha postulado que el CBD es capaz de unirse a este receptor y bloquear su actividad, por lo que sus efectos antiinflamatorios parecen derivados de esta interacción<sup>506</sup>.

## Cannabinoides como estimuladores de la autofagia

Como ya se mencionó anteriormente, uno de los eventos patológicos que aparecen en la ELA es la disfunción en las vías proteolíticas. Numerosos trabajos se han tratado en aproximaciones farmacológicas basadas en la estimulación de las vías de autofagia<sup>507,508</sup>. Sin embargo, estos tratamientos no han resultado efectivos a nivel de ensayos clínicos<sup>5,509</sup>. Si bien la activación de las vías de autofagia de manera individual no parece aportar alto beneficio a la hora de reducir el desarrollo de la patología, en conjunto con otras aproximaciones podría ser beneficiosa. El SEC está implicado en la regulación de las vías de autofagia. Se ha visto que la activación del receptor CB<sub>2</sub> produce la regulación de la vía de señalización mTOR, y con esto tiene efectos en la autofagia<sup>479</sup>, por lo que la aplicación farmacológica de un agonista CB<sub>2</sub> podría tener efectos beneficiosos adicionales también a este nivel.

## Cannabinoides frente al estrés oxidativo

Tanto las alteraciones en la recaptura de glutamato como la activación microglial durante los procesos inflamatorios induce a la aparición de las ROS, y con ello, la muerte celular por EO. Por lo tanto, la restauración en la regulación de la señalización glutamatérgica por parte del SEC reduciría la aparición de estas ROS<sup>453</sup>. Además, durante los procesos inflamatorios, se produce una inducción de la iNOS en células de microglía que se activan. Esto provoca un incremento exacerbado de la liberación de NO, que puede producir superóxidos y especies nitrificantes que dañen los diferentes sustratos celulares. La activación de receptor CB<sub>2</sub> regula de la activación de la microglía, pudiendo reducir los procesos de EO.

Además, por su estructura con características antioxidantes, los fitocannabinoides tienen gran potencial farmacológico como lavadores de radicales libres.

## Aplicación de los Cannabinoides frente a la fisiopatología de la ELA

Debido al enorme potencial terapéutico que presentan los cannabinoides por su propiedades farmacológicas, se han desarrollado numerosas aproximaciones experimentales a nivel preclínico en diferentes modelos experimentales de ELA, principalmente basados en la mutación SOD1 (**Tabla 6**). Además, los derivados cannabinoides han sido postulados para el tratamiento sintomático de las diferentes afecciones que derivan de esta enfermedad. Se han desarrollado diversos ensayos clínicos en los que se propuso la administración de  $\Delta^9$ -THC para el tratamiento de calambres musculares o la disartria y disfagia<sup>486,510</sup>. Lamentablemente, este cannabinoide solo mostró efectos leves en ciertos aspectos de la enfermedad en los pacientes. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la combinación equimolar de  $\Delta^9$ -THC y CBD ejerce efectos beneficiosos reduciendo signos patológicos como la espasticidad en pacientes de ELA<sup>487,511</sup>.

Por otro lado, actualmente se está desarrollando un ensayo clínico basado en la administración de derivados cannabinoides para el tratamiento de la ELA. Este ensayo prevé mostrar efectos neuroprotectores reduciendo la progresión de la enfermedad en pacientes tempranamente diagnosticados de ELA (entorno a los dos años del diagnóstico clínico). El compuesto cannabinoide a investigar es una combinación de CBD y  $\Delta^9$ -THC en una proporción aproximada de 25:<2<sup>488</sup>.

| Compuesto            | Farmacología                                      | Modelo  | Efecto  | Referencia                  |
|----------------------|---|---|---|-----------------------------|
| In vitro             |   |   |   |                             |
| Δ <sup>9</sup> -THC  | Agonista parcial CB <sub>1</sub> /CB <sub>2</sub> | Cultivos primarios de MN                              | Efecto antiexcitotóxico   | Abood et al. 2001           |
| 2-AG                 | Agonista CB <sub>2</sub>                          | Cultivos primarios de MN y células de glía            | Efecto antiinflamatorio   | Pasquarelli et al. 2017     |
| CBD                  | ?   | Células hGMSCs  | Efecto antiinflamatorio   | Rajan et al. 2017           |
| VCE-003.2            | Activador PPARγ                                   | Cultivos primarios de astrocitos SOD1 <sup>G93A</sup> | Efecto antiinflamatorio   | Rodriguez-Cueto et al. 2018 |
| CBG                  | Activador PPARγ                                   | Células NSC-34  | Efecto antiinflamatorio, antioxidante y antiapoptótico  | Mammana et al. 2019         |
| CBG-CBD              |   |   |   |                             |
| In vivo              |   |   |   |                             |
| Δ <sup>9</sup> -THC  | Agonista parcial CB <sub>1</sub> /CB <sub>2</sub> | SOD1 <sup>G93A</sup>                                  | Retraso en la progresión de la enfermedad<br>Aumento de la supervivencia                          | Raman et al. 2004           |
| CBN                  | Agonista parcial CB <sub>1</sub> /CB <sub>2</sub> | SOD1 <sup>G93A</sup>                                  | Retraso en la progresión de la enfermedad   | Weydt et al. 2005           |
| WIN55,212-2          | Agonista parcial CB <sub>1</sub> /CB <sub>2</sub> | SOD1 <sup>G93A</sup>                                  | Retraso en la progresión de la enfermedad<br>Efecto neuroprotector                                | Bilsland et al. 2006        |
|                      |   | SOD1 <sup>G93A</sup>                                  | Aumento de la Supervivencia   | Shoemaker et al. 2007       |
|                      |   | TDP43 <sup>A315T</sup>                                | Efecto neuroprotector   | Espejo-Porras et al. 2019   |
| Δ9-THC/CBD (Sativex) | Agonista parcial CB <sub>1</sub> /CB <sub>2</sub> | SOD1 <sup>G93A</sup>                                  | Retraso en la progresión de la enfermedad<br>Efecto neuroprotector<br>Aumento de la supervivencia | Moreno-Martet et al. 2014   |
| AM1241               | Agonista CB <sub>2</sub>                          | SOD1 <sup>G93A</sup>                                  | Retraso en la progresión de la enfermedad   | Kim et al. 2006             |
|                      |   | SOD1 <sup>G93A</sup>                                  | Aumento de la supervivencia<br>Retraso en la progresión de la enfermedad                          | Shoemaker et al. 2007       |
| HU308                | Agonista CB <sub>2</sub>                          | TDP43 <sup>A315T</sup>                                | Retraso en la progresión de la enfermedad<br>Efecto neuroprotector<br>Efecto antiinflamatorio     | Espejo-Porras et al. 2019   |
| /                    | Deleción de FAAH                                  | SOD1 <sup>G93A</sup>                                  | Retraso en la progresión de la enfermedad<br>Efecto neuroprotector                                | Bilsland et al. 2006        |
| /                    | Deleción de CB <sub>1</sub>                       | SOD1 <sup>G93A</sup>                                  | Aumento de la supervivencia   | Bilsland et al. 2006        |
| KML29                | Inhibidor MAGL                                    | SOD1 <sup>G93A</sup><br>Bajas copias                  | Retraso en la progresión de la enfermedad<br>Aumento de la supervivencia                          | Pasquarelli et al. 2017     |
| VCE-003.2            | Activador PPARγ                                   | SOD1 <sup>G93A</sup>                                  | Retraso en la progresión de la enfermedad<br>Efecto neuroprotector                                | Rodriguez-Cueto et al. 2018 |

Tabla 6. Principales ensayos preclínicos con cannabinoides en modelos de ELA. Adaptado de Urbi et. al 2019









# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La principal **HIPÓTESIS DE TRABAJO** de esta Tesis Doctoral está dirigida a confirmar que las alteraciones que se producen en el SEC durante el desarrollo de la ELA responden a un mecanismo neuroprotector endógeno, por lo que el desarrollo de terapias farmacológicas que incidan en este sistema, potenciando sus efectos, surtirán un efecto beneficioso global frente a los procesos neurodegenerativos que transcurren en esta patología.

Para validar esta hipótesis general, nos planteamos abordar los siguientes **objetivos específicos**:

1. Puesto que la sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub> descrita en la ELA responde a un mecanismo neuroprotector endógeno, se propone evaluar el efecto de la activación farmacológica del receptor CB<sub>2</sub> durante la progresión de la enfermedad en los animales, con el fin de averiguar si será capaz de prevenir la muerte neuronal y retrasar el inicio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en el modelo de ELA de TDP43<sup>A315T</sup>. Por otro lado, investigaremos las consecuencias de eliminar el receptor CB<sub>2</sub> durante el transcurso de la patología, tanto mediante el bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> como su eliminación genética.
2. Investigar el potencial terapéutico de 6 fitocannabinoides con diferentes perfiles de amplio espectro de actuación sobre el SEC y otros sistemas de neurotransmisión en el modelo de ELA de TDP43<sup>A315T</sup>, con el fin de evaluar si estos tratamientos experimentales mejorarán o retrasarán los procesos neurodegenerativos, al producir un efecto neuroprotector basado en la modulación del SEC, ejerciendo efectos beneficiosos sobre los eventos fisiopatológicos que se desencadenan en esta enfermedad.
3. Con el fin de determinar el beneficio potencial de una posible terapia combinada con fitocannabinoides, llevaremos a cabo un tratamiento experimental en combinación con el fármaco de referencia en esta enfermedad, el Riluzol.
4. Dado que el SEC está altamente conservado en la filogenia, trataremos de validar la utilización de nuevos modelos experimentales para el estudio de la participación del SEC en características fisiopatológicas concretas que ocurren en la ELA. Por lo tanto, confirmaremos que es posible utilizar los modelos experimentales desarrollados en nemátodo *C. elegans* como una herramienta válida para estudiar el papel del SEC sobre ciertos eventos fisiopatológicos que transcurren en la ELA.

Cada uno de estos objetivos ha sido investigado en esta Tesis Doctoral a través de un diseño experimental específico.









# **MATERIALES Y MÉTODOS**



# Diseños Experimentales

## Diseño Experimental 1: Estudio del papel del receptor CB<sub>2</sub> en la fisiopatología de la ELA

Este Diseño Experimental responde al **Objetivo #1** de esta Tesis Doctoral, consistiendo en evaluar el efecto de la activación del receptor CB<sub>2</sub> durante la progresión de la enfermedad en un modelo experimental de ratones transgénicos para TDP43, así como estudiar las consecuencias que tendría la eliminación tanto farmacológica como genética de este receptor.

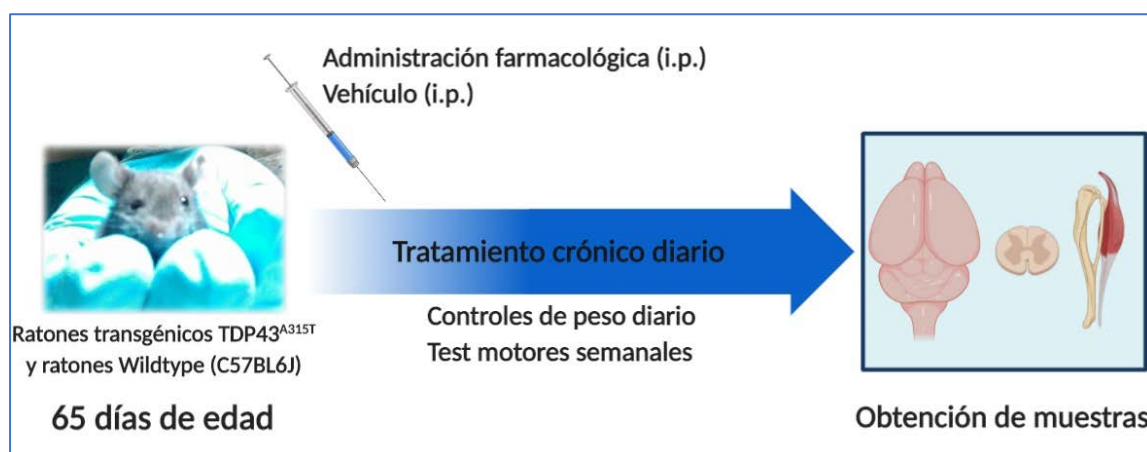
Numerosos trabajos han tratado de esclarecer el papel que desarrolla el SEC en general, y el receptor CB<sub>2</sub> en particular, en la fisiopatología de las END. Como se ha descrito en apartados anteriores de este trabajo, el receptor CB<sub>2</sub> aparece sobreexpresado en muchas END<sup>185,460,512</sup>. En la ELA se observa esta sobreexpresión tanto en muestras *postmortem* de médula espinal<sup>89</sup> y corteza cerebral<sup>189</sup>, como en diferentes modelos experimentales desarrollados en animales<sup>67,126,184,471,494</sup>. Además, la sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub> se mantiene durante todo el desarrollo de la patología<sup>67</sup>. Diferentes investigaciones han sugerido la implicación del SEC en los mecanismos compensatorios que se activan en respuesta al daño neuronal, tratando de amortiguar los efectos de los diferentes eventos fisiopatológicos que aparecen en las diferentes END. Concretamente en la ELA, numerosos trabajos realizados en modelos experimentales de la enfermedad basados en mutaciones en el gen que codifica para la proteína SOD1 apoyan su papel neuroprotector derivado de la activación del receptor CB<sub>2</sub> y su acción sobre los procesos neuroinflamatorios, lo que pone de manifiesto su importancia dentro de esta enfermedad<sup>433,461</sup>. Sin embargo, no se han desarrollado estudios con este receptor en los nuevos modelos de ELA.

Por este motivo, el primero de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue el estudio de la relevancia del receptor CB<sub>2</sub> en un modelo de ELA basado en la sobreexpresión de la proteína humana mutada TDP43<sup>A315T</sup>. Para ello, utilizamos tres aproximaciones experimentales diferentes.

- Primero, se evaluó el papel neuroprotector y/o neurorreparador de la activación farmacológica de este receptor. Para ello, se realizó un tratamiento farmacológico utilizando un agonista selectivo para el receptor CB<sub>2</sub>, el compuesto HU308 (Tocris Bioscience)<sup>513</sup>, en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>.
- Por otro lado, con el objetivo de determinar el papel neuroprotector de la sobreexpresión y posible activación endógena del receptor CB<sub>2</sub>, estudiamos el efecto del bloqueo farmacológico de este receptor en el desarrollo de la sintomatología de tipo ELA de este modelo experimental de ELA en ratón. Para ello, llevamos a cabo un tratamiento farmacológico con el agonista inverso AM630 (APE BIO).
- Por último, con el objetivo de confirmar el potencial neuroprotector que ejerce la activación del receptor CB<sub>2</sub> en periodos presintomáticos y durante la progresión de la enfermedad, se generaron y caracterizaron ratones dobles mutantes que presentan la sobreexpresión de TDP43<sup>A315T</sup> y carecen genéticamente del receptor CB<sub>2</sub>.

### 1.1 Modulación farmacológica del receptor CB<sub>2</sub> mediante el tratamiento de los ratones TDP43<sup>A315T</sup> con el agonista selectivo HU308.

Se administró el tratamiento de HU308 a la dosis de 5mg/kg de manera crónica a los animales desde el debut de la enfermedad o etapas inicialmente sintomáticas (65 días de edad) hasta estadios avanzados de la enfermedad (95 Días de edad) (**Figura 17**). Durante todo el experimento, se llevaron a cabo controles diarios observacionales del estado físico y peso de los animales, y semanalmente se realizaron pruebas comportamentales de funcionalidad motora. Tras un periodo de 30 días de tratamiento, determinado como ventana terapéutica en este modelo experimental, se procedió al sacrificio de los animales por decapitación y a la recogida de muestras de los tejidos más afectados en la enfermedad, médula espinal y músculo esquelético, para su posterior análisis. Mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas se realizaron análisis de supervivencia neuronal y del estado inflamatorio de los tejidos de médula espinal. Adicionalmente, se analizaron mediante análisis bioquímicos diferentes marcadores neuroinflamatorios que complementaron el estudio histológico.



**Figura 17. Esquema general del procedimiento llevado a cabo durante los tratamientos farmacológicos desarrollados en esta Tesis Doctoral.** Todos los animales fueron tratados a partir de los 65 días de edad. Los controles fueron tratados con el correspondiente vehículo. Tras el periodo de tratamiento, los animales fueron sacrificados y se procedió a la extracción de material biológico para los análisis histológicos y bioquímicos.

### 1.2 Modulación farmacológica del receptor CB<sub>2</sub> mediante el tratamiento de los ratones TDP43<sup>A315T</sup> con el agonista inverso AM630.

De manera similar al experimento anterior, se administró diariamente el tratamiento de AM630 a la dosis de 3 mg/kg de desde el debut de la enfermedad o etapas inicialmente sintomáticas (65 días de edad) hasta estadios avanzados de la enfermedad (90 Días de edad) (**Figura 17**). Durante todo el experimento, se llevaron a cabo controles observacionales del estado físico y peso de los animales, y semanalmente se realizaron pruebas comportamentales de funcionalidad motora. Tras un periodo de 25 días de tratamiento, se procedió al sacrificio de los animales por decapitación y a la recogida de muestras de los tejidos de la médula espinal para su posterior análisis. Mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas se realizaron análisis de supervivencia neuronal y del estado inflamatorio de los tejidos de médula espinal.

### 1.3 Diseño y caracterización de un modelo experimental doble mutante TDP43<sup>A315T</sup>; *cnr2*<sup>-/-</sup>.

En base a los datos previos de nuestros experimentos utilizando el modelo experimental de TDP43<sup>A315T</sup>, en la tercera parte de este diseño experimental quisimos evaluar cómo la ablación genética del receptor CB<sub>2</sub> podría repercutir en la progresión de la enfermedad, tanto en el debut de la patología, la progresión de los síntomas y por último en las fases avanzadas de la enfermedad (**Figura 18**). Para ello, monitorizamos el desarrollo de la patología en estos animales desde las cuatro semanas de edad, mediante el registro del peso corporal y la realización de pruebas comportamentales semanales. Para el estudio de las diferentes etapas, se sacrificaron los animales en dos puntos temporales, 56 y 84 días de edad, correspondientes a las etapas presintomática y de sintomatología avanzada en el modelo de TDP43<sup>A315T</sup>. De nuevo, se analizó en muestras de médula espinal la presencia y supervivencia de las MNs, así como la posible presencia de procesos neuroinflamatorios. Además, de manera complementaria, se llevó a cabo el análisis de los niveles de expresión génica de varias citoquinas proinflamatorias en este tejido. Por otro lado, un pequeño grupo de animales se utilizó para el análisis de la supervivencia del modelo experimental de dobles mutantes (**Figura 18**).



**Figura 18.** Esquema general de la caracterización del modelo murino de ELA carente del receptor CB<sub>2</sub>. Los animales fueron monitorizados semanalmente en el peso y funcionalidad motora desde el mes de edad hasta el día de su sacrificio. Seleccionamos dos puntos temporales para la recogida de muestras, 65 y 90 días. Además, de manera paralela llevamos a cabo un análisis de la supervivencia.

### Diseño Experimental 2: Búsqueda de nuevas dianas farmacológicas basadas en la administración de derivados fitocannabinoides en un modelo de ELA.

Debido a la falta de tratamientos verdaderamente efectivos a día de hoy contra el avance de la ELA, uno de los principales esfuerzos de esta Tesis Doctoral se dirigió hacia la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas. Este Diseño Experimental responde al **Objetivo #2** de esta Tesis Doctoral, en el que se pretende investigar los efectos neuroprotectores de 6 de fitocannabinoides con diferentes perfiles farmacológicos, y por tanto capaces de aportar nuevas dianas farmacológicas que podrían ser clave para el tratamiento de la ELA.

Por un lado, evaluamos la eficacia de compuestos cannabinoides que presentan perfiles de actuación clásicos, es decir, que actúan principalmente a través de la activación de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Este es el caso de los compuestos Δ<sup>9</sup>-THC, Δ<sup>9</sup>-THCV y (E)-BCP. Por otra parte, valoramos la utilidad de fitocannabinoides con un perfil farmacológico diferente, los cuales actúan presumiblemente a través de la activación preferencial de otras dianas del SEC

distintas de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, como son los receptores PPAR $\gamma$  o las enzimas que participan en el metabolismo de los endocannabinoides (como FAAH o COX-2). Este es el caso de los fitocannabinoides CBD, CBDA y CBDV. Cabe destacar que, en todos los casos, quisimos aprovechar las características antioxidantes derivadas de las propiedades estructurales de estos fitocannabinoides, ya que podrían resultar particularmente beneficiosas para esta patología. Como ya hemos indicado anteriormente, la activación multidiana podría resultar altamente ventajosa en la lucha contra esta enfermedad. Adicionalmente, y en vista de los resultados obtenidos, en el caso del fitocannabinoides CBDA, quisimos profundizar en el estudio de los posibles efectos beneficiosos que ejerce este compuesto en el modelo experimental de ELA basado en la mutación de TDP43<sup>A315T</sup>.

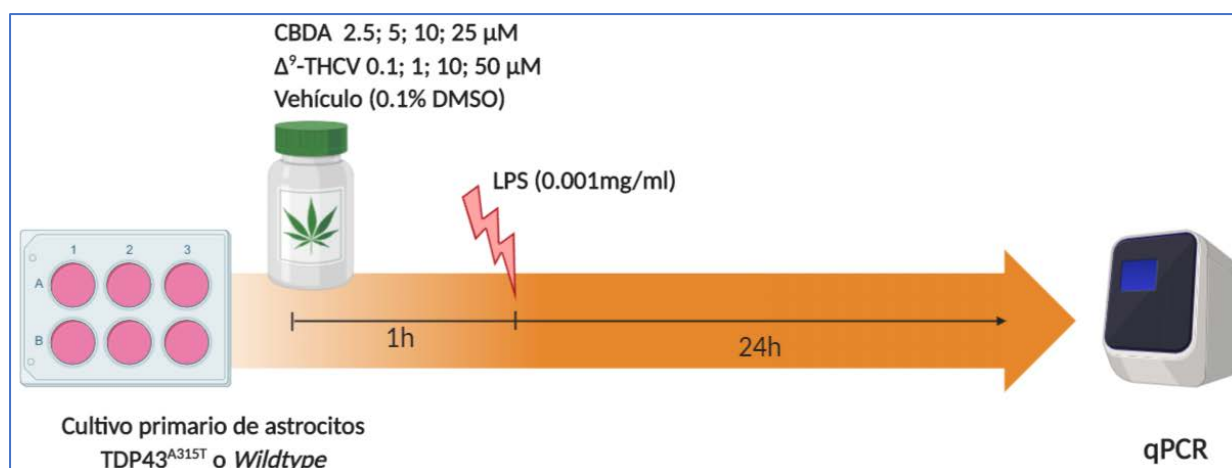
Por último, evaluamos por procedimientos *in vitro* el potencial antiinflamatorio de dos de estos fitocannabinoides, el  $\Delta^9$ -THCV y el CBDA en varios modelos de inflamación en cultivos celulares.

## 2.1 Evaluación del potencial farmacológico de 6 fitocannabinoides en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>

Para el estudio del potencial terapéutico de los fitocannabinoides seleccionados en la ELA se utilizó el modelo experimental de ELA basado en la mutación TDP43<sup>A315T</sup>. Al igual que en el diseño experimental anterior, se administró diariamente a los animales desde etapas presintomáticas hasta periodos de sintomatología avanzada (Desde el día 65 al 90 de edad). Durante todo el tratamiento, se realizaron semanalmente pruebas comportamentales para evaluar la funcionalidad motora. Tras el sacrificio de los animales, se obtuvieron muestras tanto de médula espinal como de músculo esquelético. Mediante análisis histológicos e inmunohistoquímicos de la médula espinal, se estudió la supervivencia de las MNs y la activación glial en el asta ventral. En el caso de las células de microglía, se llevó a cabo un análisis morfológico para determinar su estado de activación. Adicionalmente, se realizaron análisis bioquímicos para determinar los niveles de expresión de diferentes marcadores inflamatorios presentes en estos tejidos mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). Por otro lado, en base a los resultados obtenidos, en el caso de los animales tratados con CBDA, se procedió a la realización de diferentes pruebas adicionales para tratar de identificar los efectos positivos obtenidos con este compuesto. Para ello, se llevó a cabo tanto un análisis de oxidación proteica, para determinar su potencial antioxidante, como una evaluación de su potencial antiinflamatorio por citometría de flujo. Se analizaron por esta técnica dos marcadores típicos de activación microglial, iNOS y Arginasa1 (Arg1), relacionados con los estadios M1 y M2 de la microglía activada, respectivamente. Por último, se realizó el análisis histológico del músculo esquelético de los animales mediante una serie de tinciones específicas que nos muestran, entre otras características, alteraciones en el tamaño y forma de las fibras musculares o cambios en los patrones de ordenación de estas.

## 2.2 Estudios con fitocannabinoides en cultivos celulares

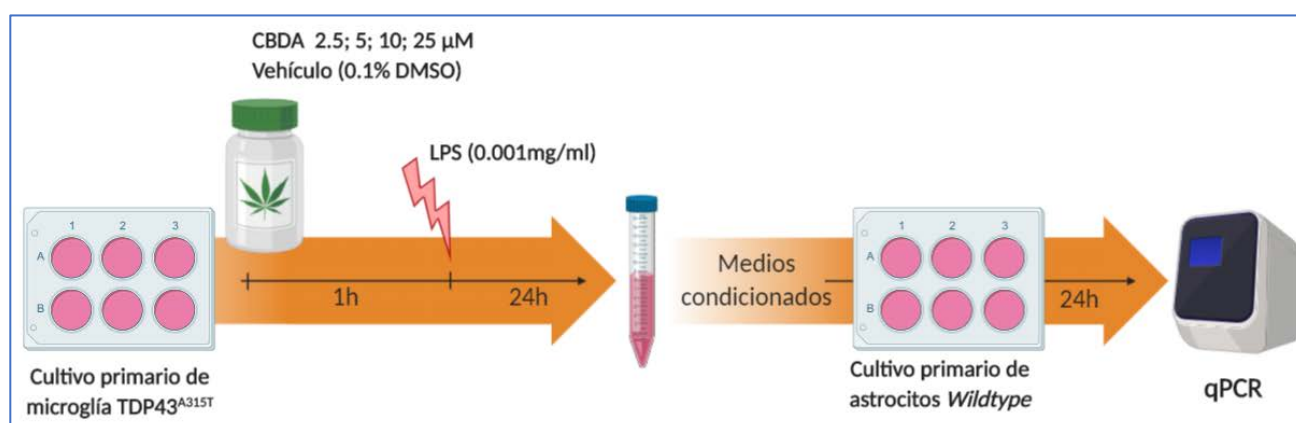
Una vez identificados los compuestos CBDA y  $\Delta^9$ -THCV como los dos compuestos con resultados más prometedores en los experimentos *in vivo*, se realizó un estudio de sus efectos *in vitro* en células de glía mediante cultivos primarios de astrocitos y microglía. El objetivo de este trabajo fue tratar de identificar el tipo celular sobre el cual el  $\Delta^9$ -THCV y CBDA ejercían su efecto beneficioso, ya que estudios previos han identificado un papel muy relevante de las células de glía en la fisiopatología de la ELA.



**Figura 19. Esquema general del procedimiento para determinar el potencial antiinflamatorio de los tratamientos frente a la respuesta inflamatoria de los astrocitos.** Esquema general de la estimulación de astrocitos procedentes de cultivos primarios.

Por un lado, se realizaron ensayos farmacológicos sobre cultivos primarios de astrocitos purificados a partir de crías de ratón procedentes de animales transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> y WT (Figura 19). Las células fueron tratadas primero con dosis crecientes de CBDA y  $\Delta^9$ -THCV y posteriormente estimuladas con la endotoxina LPS procedente de *Escherichia coli* (*E. coli*). (O111: B4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). El LPS, un componente mayoritario de la membrana de las bacterias Gram negativas, es un potente inmunoestimulante comúnmente utilizado para inducir una respuesta inflamatoria celular<sup>470,514</sup>. Una vez finalizado el periodo de tratamiento y exposición a LPS, se analizó en la fracción celular el nivel de expresión de marcadores inflamatorios.

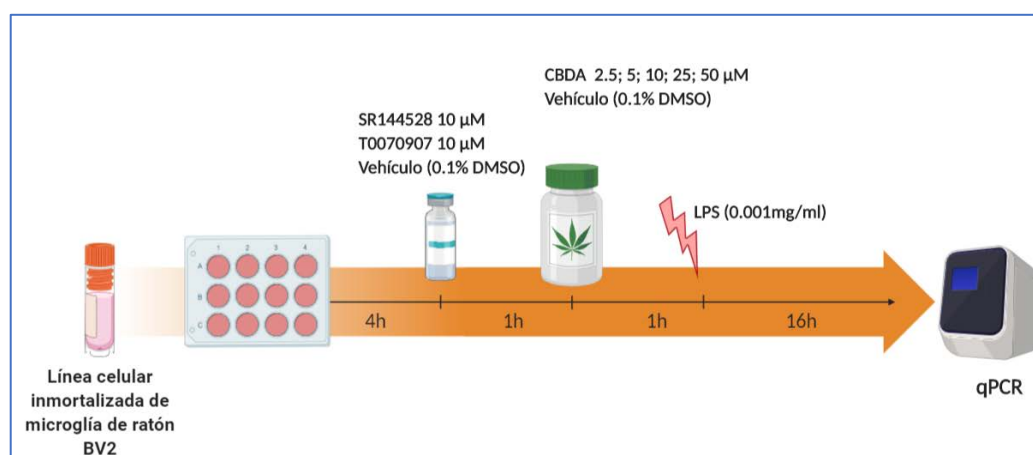
En vista de los resultados obtenidos con la administración de CBDA en los cultivos primarios de astrocitos, se realizó una segunda aproximación farmacológica con este fitocannabinoide mediante el uso de medios condicionados (Figura 20). En este caso, quisimos analizar el efecto de la administración de un medio condicionado procedente de cultivo primario purificado de microglía TDP43<sup>A315T</sup> (previamente tratada con CBDA y estimulada con LPS) en astrocitos procedentes de animales WT. De nuevo, llevamos a cabo un análisis de marcadores inflamatorios en la fracción celular.



**Figura 20. Esquema general del procedimiento para determinar el potencial antiinflamatorio del CBDA frente a la respuesta inflamatoria glial.** Esquema general de la estimulación de astrocitos a través la aplicación del medio condicionado de microglía TDP43<sup>A315T</sup> estimulada con LPS.

Debido a nuestro creciente interés por los efectos antiinflamatorios del CBDA, realizamos un estudio adicional sobre el posible mecanismo de acción de este compuesto. En esta ocasión, utilizamos una línea celular inmortalizada de microglía de ratón, las células BV2 (**Figura 21**).

En un primer ensayo, realizamos la caracterización de la respuesta celular de estas células de microglía al pretratamiento con diferentes concentraciones de CBDA y la posterior estimulación con la endotoxina LPS. Para ello, analizamos tanto marcadores inflamatorios como los niveles de expresión de elementos del SEC relacionados con la respuesta inflamatoria. En un segundo grupo de experimentos, se combinó la aplicación de CBDA con antagonistas de las principales dianas analizadas, el receptor CB<sub>2</sub> y el receptor PPAR $\gamma$ , para tratar de determinar la posible implicación de estos receptores en los efectos antiinflamatorios del CBDA en la población microglial, abordaje que es difícilmente realizable en los ensayos *in vivo*.



**Figura 21. Esquema general de la estimulación de las línea celular de microglía de ratón BV2.** Evaluación de la posible implicación de los receptores CB<sub>2</sub> y PPAR $\gamma$  en los efectos antiinflamatorios del CBDA.

### Diseño Experimental 3: Validación del potencial terapéutico del fitocannabinoide CBDA. En búsqueda de un tratamiento combinado.

Este Diseño experimental responde al **Objetivo #3** de este trabajo, en el que nos propusimos determinar el beneficio potencial de una posible terapia combinada con fitocannabinoides en la ELA. Para ello se llevó a cabo un tratamiento experimental con el fitocannabinoide CBDA en combinación con el fármaco de referencia en esta enfermedad, el Riluzol. Debido a que el Riluzol es el principal fármaco prescrito para el tratamiento de ELA, a la hora de desarrollar ensayos clínicos para nuevas terapias farmacológicas, los nuevos compuestos son administrados en combinación con el Riluzol, ya que los pacientes reclutados para los ensayos clínicos están siendo tratados con este fármaco con anterioridad. Por este motivo, a la hora de validar el potencial terapéutico de este fitocannabinoide, nos pareció necesario llevar a cabo este tipo de aproximación farmacológica.

A pesar de que la ELA es una enfermedad cada vez mejor caracterizada, a día de hoy sigue existiendo una llamativa escasez de fármacos aprobados. Hasta la reciente aprobación (en el año 2017) de la Daraviña como opción de tratamiento adicional



para la ELA<sup>515,516</sup>, el único fármaco indicado era el agente anti-glutamatérgico Riluzol, que a día de hoy continúa siendo el tratamiento más utilizado. Sin embargo, la eficacia del Riluzol es muy inconstante, debido, entre otras razones, a sus características farmacocinéticas y su metabolismo hepático tan variable. Además, este fármaco también presenta una permeabilidad en la BHE muy heterogénea, lo que limita su biodisponibilidad en el cerebro y por lo tanto su capacidad de acción<sup>515</sup>.

Bajo nuestro punto de vista, debido a que la ELA es una enfermedad multifactorial, es necesaria la búsqueda de un tratamiento desde un enfoque multidiana, ya sea con una terapia combinada, o bien con un compuesto capaz de actuar sobre diversas dianas farmacológicas potencialmente. En ese sentido, hemos encontrado en el CBDA un prometedor candidato, ya que se le atribuyen múltiples propiedades interesantes que podrían resultar en la neuroprotección de las MNs en la ELA.

Gracias a los experimentos realizados en el marco de esta Tesis Doctoral, pudimos identificar el CBDA como el fitocannabinoide más prometedor en cuanto a sus propiedades en experimentales *in vivo*, especialmente por su potente perfil antiinflamatorio. Continuando con la investigación respecto a este compuesto, **se validó la dosis óptima** de aplicación en estudios de neuroprotección *in vivo*. Para ello, llevamos a cabo un tratamiento farmacológico crónico de diferentes dosis de este compuesto. Como en los casos anteriores, durante la progresión de este experimento se monitorizó el peso de los animales a diario y se evaluó mediante pruebas comportamentales la aparición de signos de debilidad motora en este modelo experimental de ELA. Tras el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se extrajeron muestras de los tejidos más afectados en la enfermedad (médula espinal, cerebro y músculo). En las muestras de médula espinal se realizaron estudios histológicos y bioquímicos para estudiar el efecto de las diferentes dosis de CBDA en la supervivencia neuronal y los procesos inflamatorios.

Aunque existen datos previos de la utilización del Riluzol en modelos experimentales murinos, los resultados y eficacia mostrada varían entre unos modelos experimentales y otros<sup>517-520</sup>. Por este motivo, previamente a la administración conjunta con el fitocannabinoide CBDA, llevamos a cabo un experimento farmacológico con dos dosis diferentes de este compuesto, con el propósito de seleccionar la dosis óptima en nuestro modelo.

### 3.1 Evaluación de un posible tratamiento combinado CBDA:Riluzol.

En el siguiente apartado de este trabajo se investigó el potencial terapéutico del fitocannabinoide CBDA en combinación con el Riluzol, de vistas a una posible aplicación conjunta en la clínica. Una vez seleccionadas ambas dosis óptimas, diseñamos un tratamiento crónico en el que evaluamos el efecto de la administración de ambos compuestos por separado o en combinación en periodos correspondientes entre el debut de los síntomas y etapas avanzadas de la enfermedad. Como en experimentos farmacológicos anteriores, durante la progresión de este experimento se monitorizó el peso de los animales a diario y se evaluó mediante pruebas comportamentales la aparición de signos de debilidad motora en este modelo experimental de ELA. Tras el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se extrajeron muestras de los tejidos, con el fin de evaluar la supervivencia de las MNs, así como cuantificar la activación glial tanto de microglía como de astrocitos.

## Diseño Experimental 4: Estudio de la ELA en un modelo experimental de *C. elegans*. Implicación del SEC.

Por último, en este Diseño Experimental investigamos el **Objetivo #4**, en el que trataremos de validar la utilización de nuevos modelos experimentales para el estudio de la participación del SEC en ciertos eventos fisiopatológicos que transcurren en la ELA, y de este modo confirmar que es posible utilizar los modelos experimentales desarrollados en nemátodo *C. elegans* como una herramienta válida para estudiar el papel del SEC en la fisiopatología de la ELA. Esta parte de la experimentación de esta Tesis Doctoral se realizó en el contexto de una estancia breve en el grupo de investigación de la Dra. Liachko, Profesora adjunta en la División de Gerontología y Medicina Geriátrica de la Universidad de Washington, cuyo laboratorio está localizado en el centro hospitalario VA Medical Center de Seattle, EE.UU. El grupo de investigación del Dr. Kraemer, al que inicialmente pertenecía la Dra. Liachko, desarrolló una serie de modelos experimentales de ELA basados en la inserción de diferentes mutaciones humanas asociadas con la ELA en el genoma del *C. elegans*<sup>521</sup>. En esta Tesis Doctoral, hemos utilizado dos modelos experimentales de nemátodos basados en las dos principales mutaciones de la proteína TDP43 (M337V) y (A315T) que aparecen en pacientes.

Debido a la complejidad que presenta el SN de los mamíferos y el amplio rango de potenciales dianas de activación con las que cuenta el SEC, la interpretación de los mecanismos patogénicos en los que participa el SEC en ocasiones se hace muy complicada. Por este motivo, nos parece de excelente utilidad aplicar nuestro campo de investigación en END y cannabinoides a un modelo nuevo, bien caracterizado y de relativo fácil manejo, en el que la señalización de los cannabinoides a nivel molecular y neuronal puede ser directamente correlacionada con un efecto o cambio funcional y de comportamiento. El estudio desarrollado en EE.UU. durante esta estancia breve es un estudio preliminar para validar el uso de estos modelos sencillos en el contexto de la investigación en cannabinoides en ELA.

### 4.1 Caracterización funcional y muscular de dos modelos experimentales de ELA en nemátodo *C. elegans*.

En este Diseño Experimental se estudió la relación entre la aparición de defectos funcionales durante la progresión enfermedad en dos modelos experimentales de ELA y la posible alteración de marcadores musculares y en sistemas de regulación del movimiento en estos animales.

Por un lado, con el fin de caracterizar de manera conductual el fenotipo motor de estos modelos animales, se realizó la prueba de locomoción radial a dos etapas temporales, 1 hora y 24 horas, correspondientes a las etapas de desarrollo larva L4-adulto.

En relación al estudio de alteraciones funcionales, se analizaron una serie de marcadores musculares responsables tanto de la integridad estructural (genes codificantes de las proteínas estructurales de la fibra muscular) como del correcto funcionamiento (elementos de la UNM) del músculo esquelético en estos animales. Para este fin, se seleccionaron dos etapas de desarrollo, una correspondiente a periodos presintomáticos (estadio larvario L2-L3) y otra correspondiente a la aparición del fenotipo motor en el modelo experimental (estadio larvario L4- adulto de un día). Como herramienta

complementaria, realizamos modificaciones genéticas adicionales en estos modelos experimentales. Concretamente, se generaron tres modelos de animales que presentaban un marcaje fluorescente en la proteína muscular estructural MYO-3, y además presentaban, o bien la sobreexpresión de la proteína TDP43 humana, o bien las mutaciones para TDP43<sup>A315T</sup> y TDP43<sup>M337V</sup>. De este modo, evaluamos la integridad muscular de los animales.

#### 4.2 Caracterización del SEC en dos modelos de ELA de *C. elegans*

Una vez identificados los defectos funcionales y moleculares que acompañan a la disfunción motora de estos animales, se analizó el estado del sistema de señalización endógena de tipo cannabinoide (SSEC) en las dos cepas de nemátodo *C. elegans* modelo de ELA utilizadas. Esto ha sido posible gracias a que en los últimos años se han identificado diferentes ortólogos funcionales de los elementos del SEC en mamíferos<sup>222,522,523</sup>. Por este motivo, y en relación con los resultados previos de nuestro grupo en el modelo experimental de ratón prp-hTDP43(A315T), en el que observamos una clara la modificación del SEC durante la fisiopatología de la ELA<sup>184,462</sup>, quisimos evaluar los niveles de expresión de los diferentes genes de este sistema de señalización en ambos modelos experimentales de ELA desarrollados en el nemátodo, tanto en las fases larvares como en el estadio adulto. (Figura 22). En paralelo, llevamos a cabo el estudio de los niveles de expresión de diferentes elementos del sistema de neurotransmisión serotoninérgico, debido a su implicación en la regulación del movimiento en estos animales<sup>522</sup> y su afectación de los pacientes de ELA.



**Figura 22.** Esquema general de la obtención de muestras para el análisis de marcadores moleculares a las diferentes etapas de desarrollo seleccionadas.

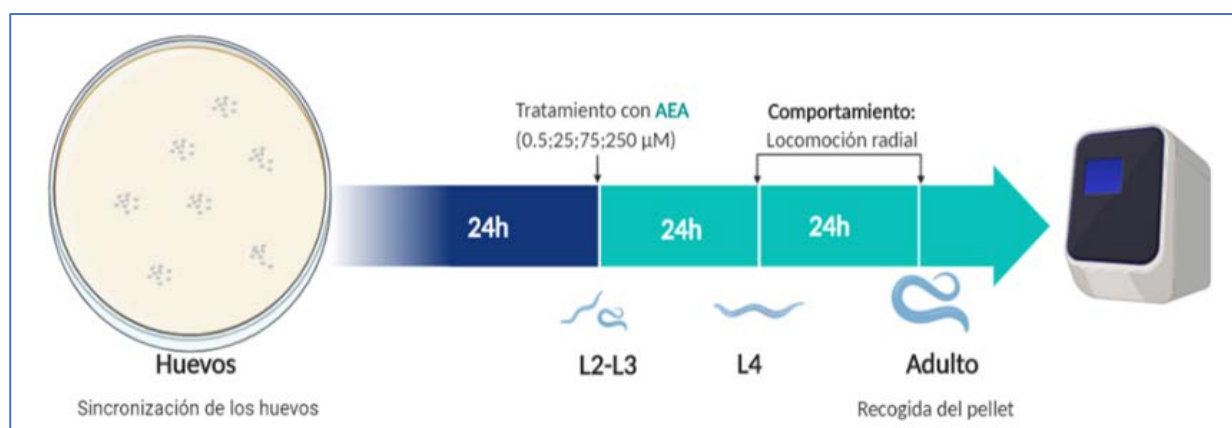
#### 4.3 Tratamiento farmacológico con AEA

Una vez caracterizado el SSEC y analizadas las diferencias entre animales que portan mutaciones para la proteína TDP43 y los controles, tuvimos la oportunidad de realizar un tratamiento farmacológico. El compuesto elegido fue el endocannabinoide AEA, en un intento de potenciar la actividad cannabinoide en estos animales. Este tratamiento se realizó en los grupos experimentales detallados en la [Tabla 7](#):

| Cepas   | Modelo   |
|---|--|
| N2  | Control  |
| npr19 <sup>-/-</sup>                          | KO-CB <sub>1</sub>                             |
| TDP43 <sup>M337V</sup>                        | Modelo de ELA                                  |
| TDP43 <sup>A315T</sup>                        | Modelo de ELA severo                           |
| TDP43 <sup>M337V</sup> ; ser4 <sup>-/-</sup>  | Doble mutante modelo ELA/ KO-5HT <sub>1A</sub> |
| TDP43 <sup>M337V</sup> ; npr19 <sup>-/-</sup> | Doble mutante modelo ELA/ KO- CB <sub>1</sub>  |

**Tabla 7. Cepas de nemátodo utilizadas en el diseño experimental 4.**

Debido a que la AEA actúa modulando directa o indirectamente la activación de los receptores CB<sub>1</sub> y 5HT<sub>1A</sub><sup>522,524</sup>, se aplicó este tratamiento tanto a las cepas de gusano TDP43<sup>A315T</sup> y TDP43<sup>M337V</sup> como a los dobles mutantes TPD43<sup>M337V</sup>;npr19<sup>-/-</sup> y TPD43<sup>M337V</sup>;ser4<sup>-/-</sup>, animales transgénicos TDP43 y KO-CB<sub>1</sub> o KO-5HT<sub>1A</sub>, respectivamente (Figura 23). Como control de eficacia del tratamiento se utilizó la cepa WT N2. Se realizó una prueba comportamental de locomoción radial en tres etapas temporales en el caso de los controles (30 minutos, 1 hora y 24 horas) y dos etapas en el caso de los dobles mutantes (1 hora y 24 horas), correspondientes a la etapa de desarrollo L4 y adulto, y se extrajo el material para su posterior análisis por técnicas bioquímicas.



**Figura 23. Esquema general del tratamiento farmacológico con AEA.**

# Procedimientos experimentales

## Procedimientos de los Diseños experimentales basados en los modelos murinos

### Animales de experimentación

La mayor parte de esta Tesis Doctoral se ha realizado utilizando un modelo experimental murino. De manera general, tanto para el mantenimiento de la colonia como para los procedimientos experimentales, los animales se estabularon, o bien en las instalaciones del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid, en el animalario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), o bien en el CAI-Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. En todos los casos, los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ( $22\pm 1$  °C) y humedad ( $55\pm 10\%$ ), y así como con un fotoperiodo constante de luz/oscuridad (12/12h), siendo el periodo de luz de 8.00-20.00 horas. Además, en todo momento, los animales tenían acceso libre a agua y comida.

Todos los protocolos de experimentación y procedimientos fueron realizados acorde a la normativa española (RD53/2013) y europea (Directiva 2010/63/EU) y de acuerdo con las normas aprobadas por el comité ético de la Universidad Complutense de Madrid y la institución reguladora. (Referencia PROEX 059/16). Los animales fueron mantenidos y estabulados bajo los criterios de bienestar animal y manteniendo criterios de rentabilización de los experimentos bajo el principio de las 3R (reducción, refinamiento y reemplazo).

El principal modelo animal transgénico de ELA utilizado para esta tesis doctoral (B6.Cg-Tg(prnp-TARDBP\*A315T)95Balo/J) fue generado por el investigador Robert H. Baloh<sup>525</sup> y adquirido por nuestro laboratorio a la empresa Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EEUU). Este animal presenta en su genoma la inserción del prp-hTDP43(A315T) en el fondo genético C57BL/6J, de manera que los ratones que la contienen expresan la proteína humana TDP43<sup>(A315T)</sup> de forma ubicua en todo su organismo. Esta mutación presenta un patrón de herencia autosómica dominante, por lo que todos los animales que heredan una copia del transgén desarrollan en fenotipo patológico. La caracterización y descripción del fenotipo de tipo ELA desarrollado por los animales fue llevada a cabo por el grupo de investigación del Dr. Baloh y posteriormente validado en nuestra colonia de animales por nuestro grupo de investigación<sup>184,525</sup>. A grandes rasgos, este modelo experimental presenta un fenotipo de disfunción motora, pérdida de MNs y gliosis compatible con los signos clínicos y afectaciones histológicas que aparecen en los pacientes de ELA. Sin embargo, estos ratones no presentan, en la ventana terapéutica establecida (detallada más adelante), déficit cognitivo ni alteración patológica de la corteza motora, signos que serían indicativos de un modelo mixto ELA-DFT.

En el caso de este modelo transgénico B6.Cg-Tg(prnp-TARDBP\*A315T)95Balo/J, para asegurar la viabilidad y supervivencia de los animales, los ratones transgénicos fueron obtenidos mediante cruces con animales de genotipo normal (o *WT*), suministrados por Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EEUU), con el mismo fondo genético (C57BL/6J) e intentando mantener el grado de parentesco en la medida de lo posible, a fin de preservar la identidad genética de todos los animales. De manera general, se trató, en la medida de lo posible, que el genotipo transgénico lo portaran los machos de cruce, a fin de garantizar el óptimo desarrollo gestacional de los animales. Además, se utilizó a los animales *WT* procedentes de los mismos cruces, es decir, hermanos de camada, como controles en cada experimento.

Debido a las características metodológicas para la generación de este modelo genético de ELA, los animales en ocasiones presentan obstrucción intestinal, lo que conlleva a un grave declive físico de estos ratones, precedido por una pérdida repentina de peso independiente al desarrollo de un fenotipo de tipo ELA. Por motivos éticos, y para evitar interferencias con los objetivos de estudio, para todos los experimentos farmacológicos realizados en esta Tesis Doctoral, establecimos como criterios de punto final la pérdida de más de un 20% del peso corporal (con respecto a la primera medida tomada), así como la pérdida brusca de peso en los animales, aunque esta no alcanzara el 20% de reducción sobre el peso inicial. Aquellos animales que cumplieran estos criterios fueron excluidos del experimento, incluidos sus valores obtenidos previamente al sacrificio compasivo.

Por otro lado, durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, con el fin de estudiar la implicación del receptor CB<sub>2</sub> en esta patología, diseñamos un modelo animal de ELA basado en la mutación TDP43<sup>(A315T)</sup> y carente del receptor CB<sub>2</sub>. Estos animales se obtuvieron mediante una serie de cruces entre animales prp-hTDP43(A315T) con animales *Cnr2*<sup>-/-</sup>, *Knock-out* para el receptor CB<sub>2</sub> (*KO*-CB<sub>2</sub>)<sup>526</sup>. Los animales *Cnr2*<sup>-/-</sup> son viables, fértiles y sin diferencias en cuanto a comportamiento y supervivencia. Este modelo animal fue generosamente cedido a nuestro laboratorio por el Dr. Romero, de la Universidad Francisco de Vitoria.

Debido a las diferencias de fenotipo patológico asociadas al sexo que presenta este modelo de ELA, en todos los procedimientos experimentales se utilizaron machos.

## Genotipado

Para el genotipado de los ratones se utilizaron las muestras de tejido procedente de las marcas de las orejas, a fin de optimizar la obtención de muestras y minimizar los procedimientos experimentales sobre los animales. Una vez obtenido el material, se extrajo el ADN genómico mediante su inmersión en tampón de lisis siguiendo las instrucciones del kit comercial REDExtract-N-Amp Tissue PCR (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Posteriormente se procedió a determinar el genotipo de los animales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Para la amplificación del material genómico se realizó una segunda etapa de este mismo kit. Las secuencias de los primers utilizados para el genotipado de cada colonia se detallan en la [Tabla 8](#).

|                                   |  |                                  |                             |
|-----------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------|
| Colonia<br>TDP43 <sup>A315T</sup> | Oligonucleótidos para TDP43 <sup>A315T</sup> | 9442                             | GGATGAGCTGCGGGAGTTCT        |
|                                   |  | 9443                             | TGCCCATCATACCCCAACTG        |
|                                   | Oligonucleótidos para control interno        | oIMR8744                         | CAAATGTTGCTTGTCTGGTG        |
|                                   |  | oIMR8745                         | GTCAGTCGAGTGCACAGTTT        |
| Colonia Cnr2 <sup>-/-</sup>       | Oligonucleótidos para TDP43 <sup>A315T</sup> | CB <sub>2</sub> GFP <sub>S</sub> | CTCGGTTACAGAAACAGAGGCTGATG  |
|                                   |  | CB <sub>2</sub> GFP <sub>A</sub> | TCTCTCTTCGAGGGAGTGAAGTGAACG |
|                                   | Oligonucleótidos para control interno        | oIMR8744                         | CAAATGTTGCTTGTCTGGTG        |
|                                   |  | oIMR8745                         | GTCAGTCGAGTGCACAGTTT        |

Tabla 8. Relación de primers utilizados para el proceso de genotipado de nuestras colonias de ratón.

Los oligonucleótidos fueron diseñados y suministrados por la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). El producto final de PCR se cargó en un gel de agarosa disuelta en tampón TBE al 2% y se procedió a su visualización con Gel Red en un transiluminador de luz ultravioleta. Como resultado, los animales *WT* presentan solo la banda correspondiente al control interno, de 200pb, mientras que los animales portadores del transgén además portarán una banda de 400pb (Figura 24).

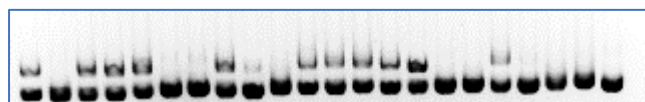


Figura 24. Muestra de gel de genotipado colonia TDP43

### Preparación de compuestos para los tratamientos farmacológicos

Debido a la naturaleza hidrofóbica de los compuestos cannabinoides, el primer paso de la preparación de los diferentes tratamientos farmacológicos fue su disolución en un disolvente orgánico. A excepción del AM630, que fue disuelto en Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), en un porcentaje del 3,2%, por debajo de las proporciones que tuvieran efectos en los tratamientos, todos los compuestos utilizados se disolvieron en etanol absoluto (Merk Millipore, Bedford, MA, EE.UU), de acuerdo con sus máximos de solubilidad. Una vez disueltos los compuestos y seleccionadas las dosis, se procedió a la realización de las alícuotas correspondientes a cada día de tratamiento y se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Puesto que los cannabinoides son compuestos altamente hidrofóbicos, precisan de un tratamiento mediante detergentes para su vehiculización en solución salina. En nuestro caso, el detergente utilizado fue Tween-80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) en una proporción 1:16 con suero salino. La solución inyectable se preparó cada día a partir de una alícuota de cannabinoide disuelto en etanol a la que se le añadió el volumen correspondiente de Tween-80. Esta mezcla se homogenizaba bien para favorecer la formación de micelas del detergente que encapsulan el compuesto, y posteriormente se procedió a la evaporación del etanol de la alícuota mediante una breve exposición a una corriente de gas nitrógeno. A continuación, se le añadió el correspondiente suero salino, se homogenizó la solución e inmediatamente después se procedió al tratamiento farmacológico de los animales. Todos los animales controles y tratados con vehículo eran administrados con una solución de Tween-80: suero salino en las mismas proporciones. En el caso del tratamiento farmacológico con AM630, debido a que su disolvente orgánico era el DMSO, los controles y vehículos fueron administrados con una solución de vehículo que contenía además la parte proporcional de DMSO. En el caso del Riluzol, se mantuvo el mismo procedimiento para la preparación del inyectable diario. A continuación,

se muestra la información detallada de los compuestos y las dosis utilizadas en el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral (Tabla 9).

| Compuesto        | Concentración          | Casa comercial     |
|------------------|------------------------|--------------------|
| HU308            | 5mg/kg                 | Tocris Bioscience  |
| AM630            | 3mg/kg                 | APE BIO            |
| $\Delta^9$ -THC  | 10 mg/kg               | GW Pharmaceuticals |
| $\Delta^9$ -THCV | 10 mg/kg               | GW Pharmaceuticals |
| E(-)-BCP         | 10 mg/kg               | Sigma-Aldrich      |
| CBD              | 10 mg/kg               | GW Pharmaceuticals |
| CBDA             | 0.1; 1; 10 y 100 mg/kg | GW Pharmaceuticals |
| CBDV             | 10 mg/kg               | GW Pharmaceuticals |
| Riluzol          | 5 y 10 mg/kg           | APE BIO            |

Tabla 9. Relación de compuestos utilizados para los tratamientos farmacológicos en el modelo experimental murino TDP43<sup>A315T</sup>

En el caso de los tratamientos *in vitro*, el disolvente orgánico utilizado fue DMSO en todos los casos. Los compuestos se disolvieron en medio de cultivo y se aplicaron en los pocillos al 0.2% de DMSO. Los pocillos control llevaron la misma proporción de DMSO (0.2%) disuelto en medio. En la Tabla 10 se muestra detallada la información de cada compuesto y la dosis a la que fue utilizado.

| Compuesto        | Concentración                     | Casa comercial    |
|------------------|-----------------------------------|-------------------|
| HU308            | 5 $\mu$ M                         | Tocris Bioscience |
| SR144528         | 10 $\mu$ M                        | Abcam             |
| Rosiglitazona    | 10 $\mu$ M                        | Sigma-Aldrich     |
| T0070907         | 10 $\mu$ M                        | Sigma-Aldrich     |
| CBDA             | 0.25; 2.5; 5; 10; 25 y 50 $\mu$ M | GW                |
| $\Delta^9$ -THCV | 10 $\mu$ M                        | GW                |

Tabla 10. Relación de compuestos utilizados para los tratamientos farmacológicos en los modelos celulares

### Desarrollo del tratamiento farmacológico *in vivo*

Basándonos en los datos descritos por nuestro grupo<sup>184</sup>, instauramos en nuestro modelo experimental prp-hTDP43(A315T) la etapa presintomática o tempranamente sintomática en los 65 días de edad, mientras que la etapa de sintomatología muy avanzada se situó en torno a los 90 días de edad. De este modo, establecimos una ventana terapéutica iniciándose en el día 65 de edad de los animales y los animales fueron sacrificados a día 95 post natal. Se utilizaron 9-10 machos transgénicos y 10-15 machos *WT* hermanos de camada, como controles.

El tratamiento o vehículo fue administrado diariamente durante 25-30 días por i.p. Los animales fueron pesados diariamente como método de control de bienestar y para el cálculo del volumen de administración, y sometidos semanalmente a diferentes pruebas comportamentales para evaluar la función motora, con el objetivo de evaluar la progresión de la enfermedad.



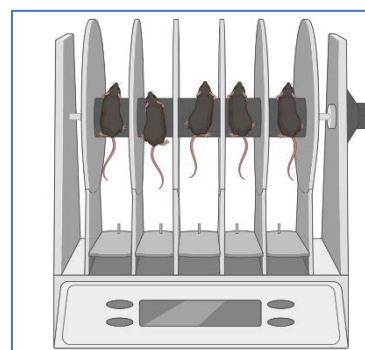
## Pruebas comportamentales

Debido a que nuestro modelo experimental muestra una disfunción motora previsible en un modelo de ELA (disonía, espasticidad, debilidad muscular, etc.), a la hora de evaluar la eficacia de los tratamientos utilizados, aplicamos una serie de pruebas comportamentales que nos permitían evaluar el desarrollo de estas alteraciones en estos animales. Por un lado, elegimos ciertas pruebas que nos permitieran evaluar las capacidades motoras de los animales, basándonos en medidas de fuerza y coordinación, como son el Rotarod y el test de *Hanging wire*. Por otro lado, quisimos evaluar ciertos reflejos musculares indicativos de pérdida de tono muscular, como es el reflejo de *Clasping* en las patas traseras. Todas estas pruebas motoras nos dan información acerca del estado funcional de la musculatura esquelética de estos animales, lo que nos permite hacer una aproximación preclínica de la eficacia de los compuestos en el modelo animal. Cada prueba comportamental realizada se repitió 3 veces y el resultado obtenido se presenta como la media de los tres ensayos. Se realizaron las siguientes pruebas comportamentales:

### Test de Rotarod

El Rotarod es un test motor que evalúa principalmente la coordinación motora, aunque también el equilibrio y la espasticidad muscular. En el caso de la ELA esta es una prueba interesante ya que nos da una idea del rendimiento de la función motora en general y en particular de la debilidad muscular en los ratones a lo largo del desarrollo de la patología<sup>527,528</sup>.

El dispositivo consiste en un rodillo giratorio de superficie rugosa (para facilitar el agarre) y de 3 cm de diámetro. El rodillo se encuentra suspendido a 30 cm de la base, lo que evita o previene que el animal se baje durante la prueba. Todos los animales fueron evaluados en un rodillo giratorio en aceleración y que giraba a contra marcha (**Figura 25**). Todos los animales hicieron la prueba en aceleración constante durante 5 minutos iniciando a 4 rpm, con una tasa de aceleración de 7.5 rpm/minuto. Como en la prueba anteriormente explicada, se recogieron 3 medidas para cada ratón, con un intervalo de 15 minutos entre las medidas, de las cuales se obtuvo el resultado de cada día haciendo la media.

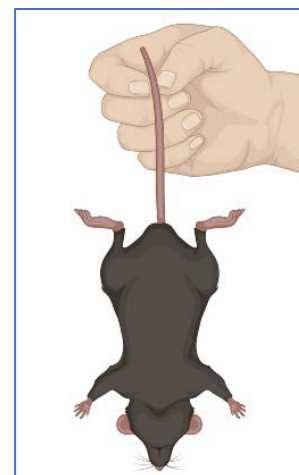


**Figura 25. Test de Rotarod**

En nuestro caso, utilizamos el protocolo elaborado por el *International Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens* (IMPreSS). Siguiendo las directrices de este protocolo y debido a la complejidad de esta prueba, los animales fueron debidamente entrenados previamente a la realización del test. Este entrenamiento consistía en 1 minuto de permanencia del ratón sobre el rodillo parado, seguido de 10 minutos de descanso. Pasados los 10 minutos, se volvía a colocar al animal sobre el rodillo y se iniciaba otro periodo de 1 minuto en el aparato, esta vez con el rodillo en movimiento a velocidad constante (4 rpm). Pasado este minuto, de nuevo se procedía a un periodo de descanso de 10 minutos, tras los cuales se repetía el último paso un total de dos veces más. Una vez finalizada la fase de entrenamiento los animales se mantuvieron en descanso un mínimo de 30 minutos antes de iniciar la prueba definitiva.

## Reflejo de Clasping

La evaluación del reflejo de clasping en las extremidades posteriores es una prueba generalmente utilizada como marcador de distonía y espasticidad muscular. Para evaluar este reflejo, se procedió de acuerdo al protocolo previamente diseñado por Stephan J. Guyenet<sup>529</sup>, con algunas modificaciones. Se mantuvo a los animales boca abajo sosteniéndolos por la cola durante 10 segundos, y se estableció un criterio de puntuación en función de la posición que adoptaban las patas traseras. En condiciones fisiológicas, los animales tienen a adquirir una postura de patas extendidas horizontalmente, de modo que estas forman una “T” con el tronco del ratón (Figura 26). En este caso se obtiene una puntuación de 0. En el caso de presentar distonía y debilidad muscular, los animales mostraban el reflejo de clasping, que consiste en la flexión de la pata, recogiénola hacia el abdomen. Cuando este reflejo tenía lugar en una sola



**Figura 26. Evaluación del reflejo del clasping en las extremidades posteriores.**

extremidad y de manera intermitente a lo largo de los 10 segundos, se le daba al animal una puntuación de 1; cuando este reflejo tenía lugar en las dos extremidades de manera intermitente, o en una extremidad de manera constante y la otra de manera intermitente, se le otorgaba al animal una puntuación de 2. Finalmente, si el animal presentaba el reflejo de clasping en ambas extremidades posteriores de manera constante, se establecía una puntuación de 3.

## **Análisis de supervivencia**

En la caracterización del modelo animal doble mutante TDP43A315T;*Cnr2*<sup>-/-</sup> se tomaron los datos de supervivencia de estos animales y se analizaron mediante una curva de Kaplan-Meier, con el fin de compararlos con el modelo murino transgénico con expresión normal del receptor CB<sub>2</sub>. Para ello, se llevó a cabo un seguimiento de los animales desde su nacimiento a su sacrificio por los criterios de punto final establecidos. En todo momento se utilizaron como referencia, además de los animales TDP43A315T, los *Cnr2*<sup>-/-</sup> y los animales *WT*. Una vez hubieron muerto todos los animales transgénicos (o fueron sacrificados por criterios compasivos de punto final) se procedió al sacrificio de los controles.

## **Sacrificio y obtención de muestras**

En el caso de los experimentos farmacológicos, una vez finalizado el tratamiento todos los animales fueron mantenidos en un periodo de lavado o reposo farmacológico de al menos 20 horas, para eliminar el posible efecto agudo del tratamiento antes del sacrificio y de la obtención del material biológico. Transcurrido este tiempo y para evitar alteraciones accidentales en la integridad de la médula espinal, se procedió al sacrificio de los animales por decapitación. Además, para evitar las posibles interferencias de la anestesia en los niveles de marcadores moleculares<sup>530,531</sup>, la decapitación se hizo de manera rápida evitando el exceso de estrés por manipulación y en ausencia de ningún tratamiento farmacológico. Este protocolo de sacrificio se siguió también en el caso de los animales del modelo experimental de dobles mutantes. Se obtuvieron

muestras de los músculos esqueléticos *Gastrocnemius* (análisis histológicos), y muestras de la médula espinal de las diferentes secciones.

## Técnicas histológicas

### Preparación de muestras

Todas las muestras de cerebro y médula espinal destinadas a técnicas histológicas fueron recogidas en una solución fría de Paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato salino, (PBS, por sus siglas en inglés) para fijar los tejidos. Tras 24 horas de fijación, las muestras se sumergieron en una solución de sacarosa al 30% diluida en PBS para deshidratar el tejido y asegurar su integridad durante el proceso de congelación. El proceso de deshidratación duraba entre 24-30 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió a la congelación rápida de las muestras en isopentano previamente refrigerado y se almacenaron los tejidos a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Por otro lado, los tejidos de músculo esquelético sufrieron un procesamiento diferente. En este caso, los tejidos fueron embebidos en la resina Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura Finetek Europe B.U., Países Bajos) para crioprotegerlos y directamente congelados en isopentano, previamente congelado en nitrógeno líquido. Para alcanzar una temperatura de congelación óptima, el isopentano debe estar en una interfase entre el estado sólido y líquido.

Una vez congelado el tejido, se realizaron secciones en un criostato Leica (Heerbrugg, Suiza) y se recogieron los cortes sobre portaobjetos previamente tratados con gelatina de origen porcino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). En el caso de los cortes de médula espinal, realizamos secciones transversales de la zona lumbar (sección comprendida entre L4-L6) con un grosor de  $20\text{ }\mu\text{m}$ . En el caso de los cortes de tejido muscular, el grosor se redujo a las  $14\text{ }\mu\text{m}$  y se realizaron cortes tanto longitudinales como transversales.

### Tinciones de la médula espinal

#### Tinción de Violeta de Cresilo

La tinción de violeta de Cresilo es una tinción física ampliamente utilizada para el método de Nissl. EL violeta de Cresilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) es un colorante basófilo por lo que tiñe los componentes básicos celulares. Debido a al carácter básico de los ácidos nucleicos, con este colorante se marcan principalmente los núcleos de las células, aunque también tiñe ciertos componentes básicos del citoplasma, como el RE rugoso (que forma los llamados cuerpos de Nissl). En este trabajo, se realizó la tinción de Nissl con el fin de visualizar y cuantificar las MNs del asta ventral de la médula espinal en las secciones comprendidas entre la zona lumbar L4 y L6 (**Figura 27**).



## Tinciones de músculo

## Tinción de Hematoxilina-Eosina

148

### Tinción de Negro Sudán

Esta tinción es específica para el marcaje de lípidos neutros y se utiliza para estudiar pequeños acúmulos o gotas lipídicas dentro de la fibra muscular. Para esta tinción se incubaron las muestras durante 20 minutos en una solución de Negro Sudán (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) al 70% en etanol precalentado. Una vez finalizado este periodo, se lavaron las muestras con agua destilada y se contra tiñeron los núcleos con hematoxilina durante 2 minutos. De nuevo se lavaron durante 10 minutos con un flujo de agua corriente constante y finalmente se montaron en medio acuoso Dako Faramount Aqueous mounting Medium (Dako, Carpinteria, CA. EE.UU.). El producto final de esta tinción se observa en un patrón de tablero de ajedrez en diferentes tonalidades de gris.

### Tinción Ácido periódico-Schiff (PAS) para glucógeno

La técnica de PAS sirve para identificar alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono. La tinción muestra la presencia de grupos aldehído formados por oxidación previa de los hidratos de carbono. En nuestro caso, utilizamos una tinción específica del metabolismo del glucógeno. Se fijaron los tejidos con una solución fría de etanol y ácido acético en proporción 1:3 durante 5 minutos. Tras un lavado con agua destilada, se incubaron las muestras con ácido periódico al 0.5% durante 3 minutos con el fin de oxidar el glucógeno presente en los tejidos y aumentar el número de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas). A continuación, se lavaron de nuevo con agua destilada y se incubaron con reactivo de Schiff durante 10 minutos. El reactivo de Schiff reacciona con los grupos aldehído y da coloración rosada púrpura. Tras este último paso, se lavaron con un flujo de agua corriente constante durante 5-10 minutos. Como paso adicional, los tejidos se contra tiñeron con Hematoxilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) durante un minuto y se deshidrataron y montaron siguiendo los pasos anteriormente descritos. Esta técnica requiere un control negativo para el cual utilizamos muestras de músculo procedentes de un animal *WT* y de un animal transgénico. Estas muestras fueron incubadas durante 1h a 37°C con una solución de  $\alpha$ -amilasa al 0.5% precalentada. Posteriormente, a estas muestras se le realizó la tinción PAS junto con las anteriores.

### Técnicas de inmunofluorescencia

De nuevo, antes de realizar la inmunofluorescencia, los cortes transversales de la médula espinal fueron atemperados durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los cortes de tejido se sometieron a un proceso de permeabilización de 1 hora con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) al 1%. Una vez transcurrido ese periodo, se lavaron los cortes con solución salina tamponada con Tris (TBS) recién preparado por un periodo de 5 minutos. Este proceso de lavado se realizó dos veces. Después del lavado, se aplicó el anticuerpo primario diluido en una solución de TBS con tritón X- 100 al 0.1% a la concentración correspondiente en cada caso (Tabla 11). El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, se lavaron los tejidos con TBS tres veces durante un mínimo de 10 minutos cada vez, y posteriormente se aplicó en anticuerpo secundario diluido en una solución de TBS con Tritón X100 al 0.01%. Este anticuerpo se incubó durante 2h a 37°C. Una vez finalizado este periodo, se lavaron nuevamente con TBS los cortes 2 veces durante un periodo de al menos 20 minutos. Por último, se produjo la tinción de los núcleos celulares con el colorante de ADN azul fluorescente Hoechst (Sigma-Aldrich) disuelto en agua destilada (10 minutos de incubación) y se procedió al

montaje de los cortes en medio acuoso (Dako, Agilent, EEUU). Las muestras se almacenaron a 4°C en condiciones de oscuridad hasta su observación en el microscopio.

| Anticuerpo | Dilución | Fabricante      | Referencia |
|------------|----------|-----------------|------------|
| GFAP       | 1:200    | DAKO Cytomation | Z033429    |
| IBA1       | 1:500    | Wako            | 019-19741  |
| ChAT       | 1:200    | AbCam           | AB144P     |

**Tabla 11. Anticuerpos utilizados para las técnicas de inmunofluorescencia de los experimentos *in vivo*.** GFAP: Proteína ácida fibrilar glial; IBA1: Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1; ChAT: Colina-acetiltransferasa

En el caso de los cultivos celulares primarios, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia con el fin de identificar las diferentes subpoblaciones celulares y obtener un ratio de pureza de los cultivos. Para ello, colocamos cubreobjetos circulares en el fondo de placas de 24 pocillos y pretratamos las placas con 15mg/ml de poli-Ornitina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Una vez finalizado el pretratamiento, las placas se lavaron con PBS, se sembraron a la densidad celular requerida (10.000 células por pocillo) y se sometieron a los correspondientes procedimientos para la purificación celular (que serán posteriormente detallados en el apartado de cultivos celulares). Finalizado este proceso, las células se fijaron con PFA al 2% disuelto en Tampón Fosfato salino Dubelcco (DPBS<sup>-</sup>) (Gibco, EE.UU.) y un suero salino fosfatado libre de calcio y magnesio durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con DPBS<sup>-</sup>, se procedió al bloqueo de las células con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 3% y Tritón X-100 al 0.3% disueltos en DPBS<sup>-</sup> durante 45 minutos a 37°C. Una vez finalizado el bloqueo, se incubaron las células durante 90 minutos a 37°C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 12), preparado en una solución de BSA al 1% y Tritón X-100 al 0.3% disueltos en DPBS<sup>-</sup> (Gibco, EE.UU.). Tras lavar nuevamente las células con DPBS<sup>-</sup>, incubamos con el anticuerpo secundario, preparado en la misma solución que los anticuerpos primarios, durante 90 minutos a 37°C. Finalmente, se produjo la tinción de los núcleos celulares durante 5 minutos con el colorante de ADN azul fluorescente Hoechst (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) disuelto en agua destilada.

| Anticuerpo | Dilución | Fabricante      | Referencia |
|------------|----------|-----------------|------------|
| GFAP       | 1:300    | Dako Cytomation | Z033429    |
| IBA-1      | 1:300    | Abcam           | 019-19741  |

**Tabla 12. Anticuerpos utilizados para las técnicas de inmunofluorescencia de los experimentos *in vitro***

## Microscopía

Todas las muestras analizadas por técnicas histológicas fueron observadas y fotografiadas en un microscopio Leica DMRB con cámara DFB300FX (Leica) siempre manteniendo intra ensayo las mismas condiciones de luz, brillo y contraste. Se utilizaron los objetivos de 10x o 20x aumentos en función de las necesidades de cada técnica. La cuantificación de intensidad de marcaje se realizó mediante el software *Image J* (NIH, EE.UU.)<sup>533</sup> y los resultados se expresaron en porcentaje respecto a los controles. Se contabilizaron en cada caso 10-12 imágenes por sujeto experimental en las secciones de médula espinal.

### Análisis de la morfología celular

Llevamos a cabo un análisis adicional atendiendo a la morfología celular en las muestras con inmunomarcaje específico para las células de microglía. Para ello, mediante el software *Image J* (NIH, EEUU), se cuantificó el área celular y la longitud de las prolongaciones celulares con el fin relacionar la morfología celular con su estado de activación.

## Técnicas bioquímicas

### Preparación de muestras

Todas las muestras destinadas a análisis bioquímicos fueron directamente congeladas en isopentano (VWR, EE.UU.) frío inmediatamente después del sacrificio de los animales con el fin de evitar la degradación de las muestras por acción de ARNasas y proteasas. Una vez congeladas se guardaron a  $-72^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

1. **Extracción de ARN.** Para el análisis por RT-PCR seleccionamos muestras de alrededor de 12mg de peso de tejido en el caso de los experimentos *in vivo* y el material correspondiente a alrededor de 1350.000 células en el caso de los experimentos *in vitro*. En el caso de la médula espinal, utilizamos tejido de la zona lumbar, mientras que en el caso de los análisis de músculo esquelético utilizamos una porción del *Gluteus medius*. Primero, aislamos el ARN de las muestras mediante el método de trizol (TRI-Reagent, Sigma) siguiendo las indicaciones del fabricante. Primero disgregamos el tejido mediante la utilización de micro pistilos o politrón y el pellet celular mediante su paso por jeringuillas de 25G de diámetro. Esta disgregación se realizó en todos los casos en 1 ml de reactivo de trizol. Tras 5 minutos de incubación, añadimos 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo y mezclamos vigorosamente durante 15 segundos. Una vez mezclado, se incubaron todas las muestras durante 12 minutos e inmediatamente después se centrifugaron durante 15 minutos a 13.414 y  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras esta centrifugación, se obtuvieron 3 fases: una fase superior que contenía el ARN, una fase intermedia con el ADN y una fase inferior con fenoles y proteínas. Transferimos la fase superior a un tubo eppendorf estéril y le añadimos 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol. Mezclamos por inmersión cada tubo y lo incubamos a temperatura ambiente durante 8 minutos. El isopropanol propicia el precipitado de los ácidos nucleicos, por lo que tras la incubación centrifugamos nuevamente las muestras durante 10 minutos a 13.000 rpm. Una vez centrifugadas, retiramos el isopropanol y añadimos 1ml de etanol  $70^{\circ}$  frío. Centrifugamos las muestras a 4465 g durante 5 minutos. Finalmente, tras retirar el etanol, diluimos nuestras muestras de ARN en 25-30  $\mu\text{l}$  de agua libre de ARNasas. Una vez disueltas, las muestras se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.
2. **Extracción de Proteínas.** Para la realización de la técnica de inmunoblot de proteínas, previamente procedimos a la extracción de proteínas de nuestras muestras de médula espinal (zona lumbar). Para ello, los tejidos previamente congelados directamente en isopentano, fueron descongelados en hielo y pesados. Utilizamos alrededor de 10 mg de muestra en cada caso. Una vez descongeladas, las muestras se homogenizaron en 100 $\mu\text{l}$  de tampón RIPA (1% tampón PBS, 0.5% de Deoxicolato sódico, 1% NP-40, 0.1% de Dodecilsulfato sódico (SDS) y PMSF 1mM) con ayuda de micropistilos. Adicionalmente se añadió al tampón RIPA un inhibidor de fosfatasa, *Halt*

*Phosphatase Inhibitor cocktail* (Thermo Fisher Scientific Ltd, Leicestershire, Reino Unido), para preservar las muestras de la acción de estas enzimas. Una vez homogenizado, se incubaron 30 minutos en hielo (con una homogenización a los 15 minutos de incubación) y se centrifugaron 10 minutos a 13.414 g a 4°C. Una vez finalizada la centrifugación, se recuperaron los sobrenadantes y se guardaron a -70°C a la espera de ser utilizados.

#### Análisis de la expresión génica

Para determinar posibles cambios en la expresión génica se realizó un análisis en los niveles de ARNm de los diferentes marcadores de interés (**Tabla 13**) mediante la técnica de RT-PCR. El ARN aislado de las muestras se cuantificó mediante la medida de absorbancia a 260 nm en un lector de placas Syner HTX multi-mode reader (Biotek, Winooske, USA), comprobando su pureza mediante el ratio de absorbancias 260/280nm. Una vez seleccionada la cantidad de ARN total para llevar a cabo la reacción, se sometió a las muestras a un proceso de retro transcripción mediante el kit comercial QuantiTect Reverse Transcription (Quiagen, Limburgo, Países Bajos). Este kit consta de una primera etapa de eliminación de posibles contaminaciones de ADN genómico (*Wipeout buffer*) y una segunda etapa de retro transcripción.

Una vez obtenido el ADN complementario (ADNc) se realizó el ensayo de amplificación en placas de 96 pocillos en un volumen final de 10µl. Para ello, se utilizaron el reactivo comercial FastStart Taqman Probe Master (Roche,) y los cebadores y sondas Taqman específicos para cada transcrito (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

| Gen          | Proteína        | Referencia Sonda |
|--------------|-----------------|------------------|
| Gapdh        | GAPDH           | Mm99999915_g1    |
| Cnr2         | CB <sub>2</sub> | Mm00438286_m1    |
| Gpr55        | GPR55           | Mm02621622_s1    |
| PparY        | PPAR $\gamma$   | Mm01184322_m1    |
| Tlr4         | TLR4            | Mm00445273_m1    |
| Faah         | FAAH            | Mm00515684_m1    |
| COX-2        | COX-2           | Mm00478372_m1    |
| IL-6         | IL-6            | Mm00446190_m1    |
| Tnf $\alpha$ | TNF $\alpha$    | Mm99999068_m1    |
| IL-1 $\beta$ | IL-1 $\beta$    | Mm00434228_m1    |
| IL-10        | IL-10           | Mm01288386_m1    |
| iNOS         | iNOS            | Mm00440502_m1    |

**Tabla 13. Relación de genes analizados en las muestras de ratón. IL-6: Interleucina 6**

Como control de normalización se utilizaron los niveles del gen de la Glicer aldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), ya que esta enzima glucolítica no presenta alteraciones en la ELA. Además, como control interno de la técnica, en cada ensayo se incluyeron controles negativos, tanto pocillos con muestras retrotranscriptasa negativas (RT-), como pocillos de sonda sin muestra (para identificar posibles artefactos en la emisión fluorescente).

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Step-one plus Real-Time PCR System (Applied Biosystem) siguiendo las recomendaciones del fabricante para este tipo de sondas y el límite de ciclo o *threshold cycle* (Ct) fue calculado por el software del aparato. Los niveles de expresión fueron calculados por el método de la segunda derivada o  $2^{-\Delta\Delta CT}$  <sup>534</sup>.



### OxyBlot

De manera adicional, mediante el uso de un kit comercial, *Oxyblot™ Protein Oxidation Detection kit* (Millipore, USA), valoramos el estado de oxidación de proteínas de nuestras muestras. Previamente, cuantificamos los niveles de proteínas de las muestras con el método de Lowry y siguiendo las indicaciones del kit Bio-Rad DC protein Assay. (Bio-Rad, CA, EEUU), utilizando BSA como proteína estándar para construir una curva patrón. Se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Varioskan (Thermo Fisher Scientific Ltd, Leicestershire, Reino Unido). Una vez determinada la concentración proteica a la que desarrollar el ensayo de *OxyBlot* (10µg), se prepararon las muestras para cargarlas en el gel de electroforesis. Las muestras se prepararon en agua destilada con una solución comercial de 2,4-Dinitrofenilhidrazida (DNPH) y el detergente SDS al 10%. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se añadió una solución de neutralización y el agente reductor β-mercaptoetanol.

Una vez preparadas las muestras, se procedió a su aplicación en un gel de poliacrilamida al 12% TGX Stain-Free FastCast premixed acrylamide solutions (Bio-Rad, CA, EE.UU.). Estos geles permiten la detección rápida de las proteínas mediante emisión fluorescente. La electroforesis se llevó a cabo en tampón Tris-glicina en presencia de SDS 1% durante 40 minutos a 190-240V. Tras la electroforesis, se transfirieron las proteínas a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU) mediante el uso de un Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, CA, EE.UU.) y se tomó una imagen de la membrana para comprobar la eficiencia de la transferencia y para tener un registro de las proteínas totales transferidas por muestra, para la normalización posterior. Las membranas fueron bloqueadas con leche en polvo desnatada al 4-5% en TBS-T, durante una hora a temperatura ambiente. Para la inmunodetección de las proteínas se utilizaron los anticuerpos comerciales proporcionados por el kit comercial en las condiciones de tiempo, temperatura y concentración indicadas. Finalmente se procedió al revelado de las muestras mediante el uso del kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagen (GE Healthcare, Amersham, Suecia) en un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, CA, EE.UU.) y la intensidad de cada muestra se cuantificó mediante su análisis densitométrico con el programa informático ImageLab (Bio-Rad CA, EE.UU.). Cada muestra se realizó con su pertinente control negativo, por lo que la normalización se hizo en referencia a estos. Los datos se representan como porcentaje normalizado respecto al valor de los grupos control.

## **Cultivos celulares**

### Cultivos de líneas celulares inmortalizadas

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado dos tipos de cultivos celulares. Por un lado, utilizamos la línea inmortalizada de microglía de ratón BV2, generosamente cedida por la Dra. Isabel Lastres (UAM), para estudiar las dianas celulares a través de las cuales nuestros compuestos de interés ejercen sus efectos.

En esta aproximación experimental quisimos reproducir parcialmente una condición patológica que sucede en esta enfermedad neurodegenerativa, la neuroinflamación. Para ello, llevamos a cabo la estimulación de estas células con la

endotoxina LPS, induciendo así la respuesta inflamatoria de estas células y, por lo tanto, la liberación de citoquinas y factores proinflamatorios. Previo a la estimulación, las células fueron tratadas, o bien con vehículo, o bien con los diferentes compuestos de interés.

Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo Dubelcco's Modified Eagle's (DMEM) (Gibco, EE.UU.) enriquecido con un 10% de suero fetal bovino (FBS, de sus siglas en inglés) y un 1% de una mezcla de antibióticos de amplio espectro (Ampicilina, anfotericina y estreptomycin) (Lonza, Verviers, Bélgica). A partir de este momento denominaremos a este medio de cultivo DMEM completo.

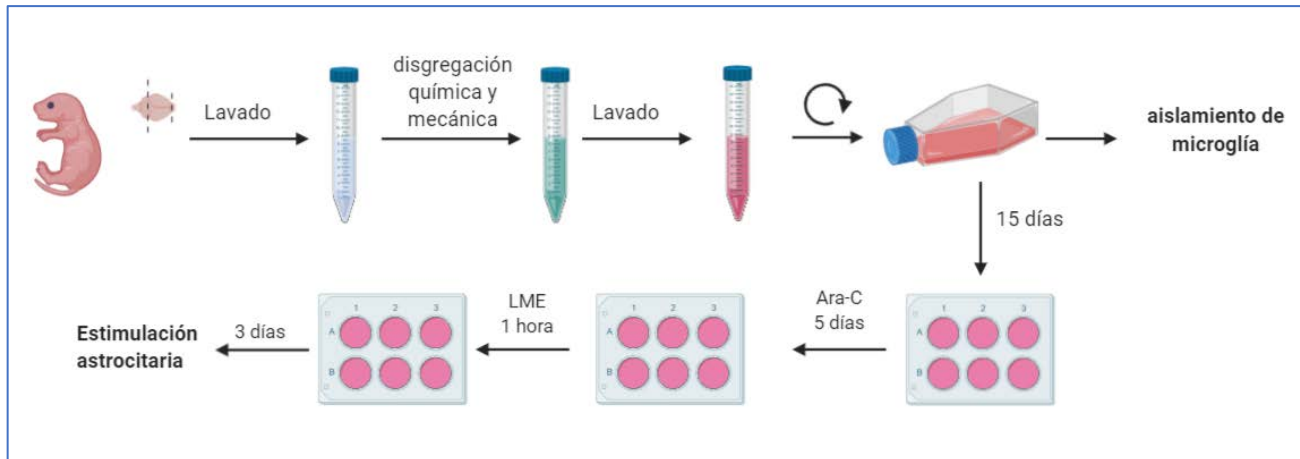
Para la realización de los experimentos de estimulación con LPS, se seleccionaron placas de 12 pocillos en las que se sembraron 450.000 células por pocillo en medio parcialmente privado de suero (DMEM 1% de FBS). Una vez transcurridas las 4 horas tras la siembra en las placas, se procedió a la realización del experimento. Se desarrollaron 4-5 replicados por cada grupo experimental.

#### Cultivos Primarios

Los cultivos primarios de astrocitos y microglía se realizaron a partir de material obtenido de crías de ratón de 0-4 días de edad (**Figura 28**). Se procedió al sacrificio de los animales mediante decapitación y posteriormente se obtuvo una pequeña muestra de las colas de los animales para su genotipado. Se extrajeron los cerebros de los ratones con ayuda de material quirúrgico de precisión y se sumergieron en tampón DPBS<sup>-</sup> frío. Con ayuda de una lupa, se diseccionaron los cerebros para eliminar tanto cerebelo como bulbos olfatorios y se extrajeron las meninges. Una vez conocido el genotipo de los animales, los cerebros se traspasaron a tubos Falcon de 14 ml a razón de 3-5 cerebros por tubo. A continuación, se procedió a la disgregación mecánica (mediante el paso constante por una pipeta de vidrio) y enzimática (gracias a la adición de tripsina 2.5%) de los tejidos en condiciones de esterilidad. Para favorecer la disgregación se añadió DNasa a los tubos de muestra. Una vez obtenido el homogenizado de células, se añadieron 5ml de medio de cultivo DMEM completo y se centrifugaron durante 10 minutos a 250 g a 4°C. Tras esta centrifugación se procedió a la resuspensión del pellet obtenido en medio de cultivo DMEM completo y se sembraron las células en flask de 75T (BIOFIL) pretratados con 15 mg/ml de poli-Ornitina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

Tras un periodo de dos semanas de crecimiento de los cultivos, se procedió a levantar las células del fondo del flask con ayuda de enzimas de digestión como la tripsina, y sembraron 100.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos pretratadas con 15mg/ml de poli-Ornitina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Debido a que las células de microglía son células semiadherentes, antes de aplicar la solución de tripsina, separamos mecánicamente las células de microglía, mediante pequeños golpes en la base de los flask. De este modo, estas células quedaron flotando en el medio de cultivo. Una vez retirado este medio a un tubo Falcon, se procedió a la tripsinización de los flask para obtener el resto de las células del cultivo, que fueron retiradas a otro tubo Falcon diferente. Todos los medios con células fueron centrifugados durante 10 minutos a 500 g a 4°C y sembrados en placas tratadas con poli-Ornitina. En el caso de los cultivos de astrocitos, se llevaron a cabo diferentes pasos adicionales para la purificación de los cultivos celulares. Por un lado, se trató al cultivo celular con el inhibidor de mitosis ARA-C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) para frenar la división celular de las células del cultivo.

Además, 5 días antes de la realización de los ensayos de estimulación, se añadió un tratamiento de 25 minutos de L-leucina metil éster (LME) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) para provocar la depleción selectiva de la microglía que pudiera haber quedado en nuestro cultivo. Tras el tratamiento, se cambió al medio de cultivo y se dejó reposar durante 24-48 h antes de proceder a los experimentos. El día del experimento de estimulación, se sustituyó el medio de cultivo DMEM completo por medio parcialmente privado (DMEM 1% FBS).



**Figura 28. Esquema de aislamiento de astrocitos y microglía procedente de cultivos primarios de ratón.**

## Citometría de flujo

Para la técnica de citometría de flujo se utilizaron las médulas espinales completas de los animales objeto de estudio. Tras el sacrificio de los animales por decapitación, se extrajeron las médulas y se mantuvieron en todo momento en hielo en tubos con tampón PBS frío. Una vez obtenidas todas las médulas, se homogeneizaron en tampón PBS con ayuda de un homogenizador de pistilo de vidrio. Una vez el tejido estuvo homogéneamente disgregado, se centrifugó a 900 g durante 6 minutos a 10°C y posteriormente se resuspendió en Percoll (GE Healthcare, Reino Unido) al 35%. A continuación, se realizó una segunda centrifugación de 2000 g durante 20 minutos con el fin de formar un gradiente y retirar la mielina de la muestra. Una vez eliminada la mielina, se volvió a centrifugar a 900 g durante 6 minutos a 10°C y posteriormente se añadieron los anticuerpos primarios extracelulares (**Tabla 14**) para caracterizar las células de microglía. La incubación de estos anticuerpos se realizó durante 1h a 4°C en condiciones de oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó la muestra y se centrifugó a 900 g durante 6 minutos a 10°C. Las muestras fueron fijadas en oscuridad durante 5 minutos con PFA al 4% (PanReac Applichem) en agua destilada. Posteriormente, sometimos al tejido a un proceso de permeabilización previa a la aplicación de los anticuerpos primarios intracelulares de interés (**Tabla 14**). Este pretratamiento consistió en la incubación de las muestras en condiciones de oscuridad durante 5 minutos con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) 0.1% en PBS. A continuación, se procedió a la incubación de las muestras 1h a 4°C en condiciones de oscuridad con los anticuerpos primarios intracelulares disueltos en la misma solución utilizada en la permeabilización. Finalizado este periodo, se lavaron las muestras una vez más con PBS y se fijaron con PFA al 1% disuelta

en PBS. Las muestras se almacenaron durante toda la noche a 4°C antes de su paso por el citómetro de flujo a la mañana siguiente.

| Anticuerpo     |                      | Dilución | Casa comercial | Referencia      |
|----------------|----------------------|----------|----------------|-----------------|
| Extracelulares | APC/Cy7 CD11b        | 1:200    | Biolegend      | 101225          |
|                | PE/Cy7 CD45          | 1:200    | Biolegend      | 103113          |
| Intracelulares | NOS2 (C-11): sc-7271 | 1:40     | Sta. Cruz      | (C-11): sc-7271 |
|                | PE-conjugado 1/ARG1  | 1:40     | R&D Systems    | IC5868P         |

Tabla 14. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo

Análisis de citometría de flujo

Para el análisis de poblaciones celulares utilizamos el programa *Kaluza Analysis Software* (Beckman Coulter). Primero, en función de la complejidad y tamaño de la población realizamos la determinación de la población viable, eliminando el posible fondo (Figura 29A). De esa población seleccionada, identificamos las células positivas para el biomarcador CD11b (CD11b<sup>+</sup>), que son las células mieloides de microglía y macrófagos (Figura 29B). De las células CD11b<sup>+</sup>, clasificamos la población en función de su expresión del marcador CD45, marcador específico del linaje hematopoyético (a excepción de células plaquetarias y eritrocitos) que también es expresado en menor medida por las células de microglía. Así, podemos distinguir entre CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>High</sup>, población que engloba a los macrófagos infiltrados y microglía activada, o CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>Low</sup>, población que hace referencia a la microglía en estado de reposo<sup>535,536</sup> (Figura 29C). Tanto en la población total de células CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> como en estas dos poblaciones realizamos el análisis de los biomarcadores iNOS y Arg1. La ratio de expresión de estos marcadores nos definió el fenotipo predominante en cada muestra.

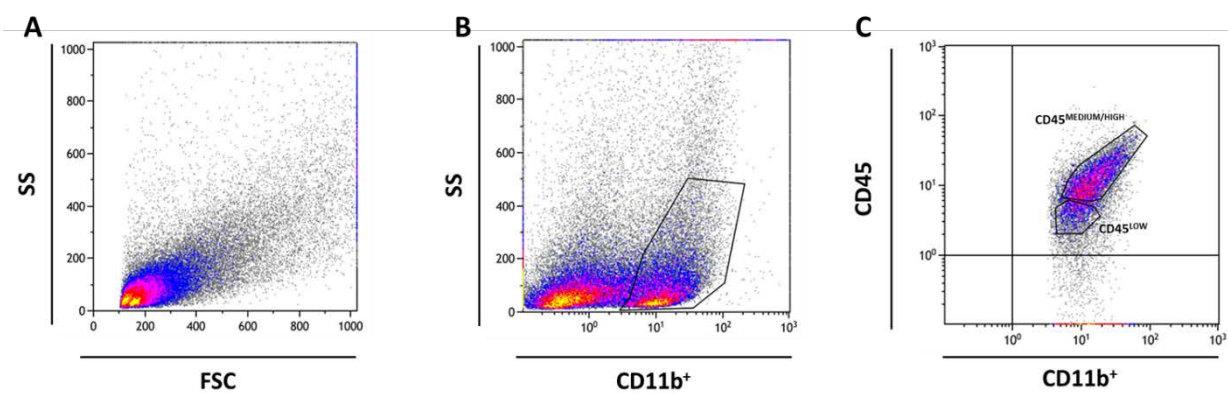


Figura 29. Selección de poblaciones celulares CD11b<sup>+</sup>. (A) Determinación de la población viable en función del tamaño y la complejidad de las células (B) Identificación de las células CD11b positivas (C) Clasificación de las poblaciones de microglía en función de su estado de activación. SS: Side scatter FSC: Forward scatter.

## Procedimientos del diseño experimental basado en los modelos de nemátodos

### Animales de experimentación

Los modelos experimentales de proteinopatía asociada a TDP43 fueron generados y caracterizados por el grupo de investigación de la Dra. Nicole F. Liachko (Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington)<sup>521</sup>. En este trabajo hemos utilizado aquellos modelos que presentan la inserción pan-neuronal de la proteína TDP43 con las mutaciones A315T y M337V. Ambas cepas de nemátodo presentan disfunción motora severa y acortamiento de su esperanza de vida. Además, ambos modelos presentan degeneración de las MNs acompañada de hiperfosforilación, truncamiento y ubiquitinación de la proteína TDP43, modificaciones postraduccionales que provocan la acumulación de depósitos insolubles de esta proteína en los animales<sup>521</sup>. Para la generación del modelo se coinyectaron los transgenes de interés con un marcador fluorescente rojo bajo el control de un promotor específico de neuronas y faringe, por lo que los gusanos que insertaron el transgén presentaban además la faringe marcada en rojo<sup>521</sup>.

Además, se utilizaron dos cepas transgénicas adquiridas por el grupo de investigación a propósito de esta estancia breve. Por un lado, adquirimos la cepa de gusano *ser4*<sup>-/-</sup> que carece del ortólogo del receptor humano de serotonina 5HT<sub>1A</sub>; y la cepa de gusano *npr19*<sup>-/-</sup> que carece del ortólogo de los receptores humanos CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>. Por último, trabajamos con otras dos cepas transgénicas de interés para nuestro trabajo, una cepa con la inserción pan-neuronal de la proteína humana TDP43 *WT*, y una cepa con un marcador fluorescente rojo bajo el control de un promotor específico de músculo esquelético, que a consecuencia de su inserción presentaba marcada la pared corporal en rojo. Gracias al corto ciclo de vida y la gran fertilidad que presentan los nemátodos, tuvimos la posibilidad de cruzar las distintas cepas de gusanos para generar los modelos de dobles mutantes que se detallan en la **Tabla 12**.

El mantenimiento de todas las cepas de nemátodos se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido por el método diseñado por Sydney Brenner<sup>537</sup>. Los gusanos fueron cultivados en placas Petri con base de agar y medio de crecimiento de nemátodos (NGM, por sus siglas en inglés) y sembradas con una capa de bacterias OP50 (cepa mutante de *E.coli* que requiere de uracilo para crecer, lo que previene del sobrecrecimiento bacteriano) y dentro de incubadores especializados con unas condiciones de humedad y temperatura muy controladas. En nuestro caso, las colonias de gusanos fueron mantenidas en placas de 5 cm de diámetro a 15 °C de temperatura.

| Cepas adquiridas |                              | dobles mutantes generados |   |
|------------------|------------------------------|---------------------------|---|
| N2               | <i>WT (WT)</i>               | CK423;AQ866               | TDP43 <sup>M337V</sup> ; <i>Ser-4</i> <sup>-/-</sup>  |
| CK410            | TDP43 <sup>WT</sup>          | CK426;AQ866               | TDP43 <sup>A315T</sup> ; <i>ser-4</i> <sup>-/-</sup>  |
| CK423            | TDP43 <sup>M337V</sup>       | RB1668;CK423              | TDP43 <sup>M337V</sup> ; <i>npr-19</i> <sup>-/-</sup> |
| CK426            | TDP43 <sup>A315T</sup>       | CK423;CK258               | TDP43 <sup>M337V</sup> ; músculo marcado              |
| RB1668           | <i>npr-19</i> <sup>-/-</sup> | CK426;CK258               | TDP43 <sup>A315T</sup> ; músculo marcado              |
| AQ866            | <i>Ser-4</i> <sup>-/-</sup>  | CK410;CK258               | TDP43 <sup>WT</sup> ; músculo marcado                 |
| CK258            | músculo marcado              |                           |   |

**Tabla 15.** Cepas de *C. elegans* utilizadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

## Genotipado y diseño de primers

En el caso de los modelos de *C. elegans*, los genes utilizados para el genotipado e identificación de los animales fueron diseñados a partir de las secuencias específicas de cada gen, disponibles en la base de datos WormBase. Los primers fueron diseñados con ayuda de la herramienta on-line PRIMER3 que permite elegir primers complementarios específicos de la secuencia de interés.

Para cada cepa de gusano mutada se eligieron 3 primers diferentes para formar dos pares, uno que flanquease la secuencia mutada y otro que solo flanquease la mutación por un extremo. Como resultado, se obtendrían 3 fragmentos de ADN de diferente tamaño (Figura 30).

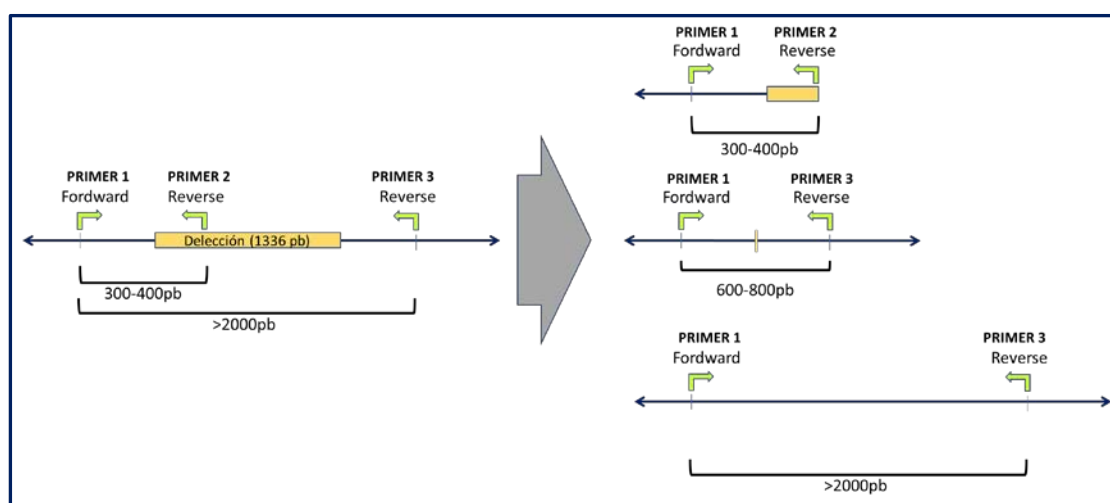


Figura 30. Esquema explicativo del diseño de Primers de genotipado.

Para el genotipado de los gusanos se utilizaron muestras de 10 µl (alrededor de 10-15 gusanos) procedentes de placas de gusanos en confluencia. Para ello, se inundaron las placas con tampón M9 y se volcaron ligeramente para recoger con una pipeta 10 µl de muestra. Una vez obtenido los animales, se añadieron 10 µl de un tampón de lisis comercial (InVivo Biosystems, EE.UU.) y 0.05µl de proteinasa K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y se procedió a la obtención del material genómico de los animales mediante el uso de un termociclador. Una vez obtenido el ADN se amplificó mediante la PCR utilizando los primers de interés para cada gen (Tabla 16) a la concentración de 1 µM.

Al producto final de PCR se le añadieron 2 µl de marcador de carga para ADN (Bio-Rad, CA, EE.UU.) Se cargaron las muestras junto a un patrón de bases de AND en un gel de agarosa disuelta en tampón TBE al 1% y se procedió a su visualización con SYBR Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en un transiluminador de luz ultravioleta (Figura 31).

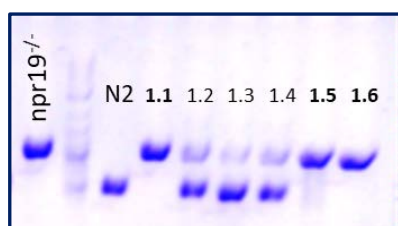


Figura 31. Muestra representativa del gel de genotipado de las cepas de nemátodo

Como resultado obtuvimos un gel con los siguientes supuestos (Figura 30):

1. Las muestras procedentes de placas con animales *WT* presentarán una banda de gran tamaño (>2000pb), resultado de la amplificación llevada a cabo por el primer que flanquea la mutación al completo, y otra banda más pequeña (~300-400pb) que procede de la amplificación llevada a cabo por el primer que solo flanquea un extremo de esta.
2. Las muestras procedentes de placas con animales que presenten la mutación en homocigosis mostrarán solo una banda de tamaño intermedio (~600-800pb) que corresponderá a la amplificación de la secuencia solo la banda correspondiente.
3. Las muestras procedentes de placas con animales heterocigotos para la mutación presentarán 3 bandas, ya que en su ADN tienen una copia del gen al completo y otra copia del gen mutado, por lo que los primers que flanquean la mutación al completo amplificarán por un lado la secuencia al completo, y por otro una secuencia de tamaño intermedio correspondiente a la amplificación del gen mutado.

En teoría, tanto los animales heterocigotos como *WT* deberían presentar una banda adicional de pequeño tamaño correspondiente a la secuencia amplificada por los primers que flanquean solo un lado de la mutación, pero en la práctica esta banda rara vez aparece.

| Gen          | ortólogo                         | Forward              | Reverse1            | Reverse 2              |
|--------------|----------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| <b>npr19</b> | CB <sub>1</sub> /CB <sub>2</sub> | AGTGGGGAAATCCCAAAAAC | TGGTACACCGGAGTTGTCA | CCTGCGGCAATGCTAAAA     |
| <b>ser4</b>  | 5HT <sub>1A</sub>                | GTGCTCACGGAGCAGAAAAC | TGGAGGGTCTCGAAAAATG | TCCAACAAAACATCTCATTTAG |

**Tabla 16. Secuencias de los primers utilizados para el genotipado de las cepas dobles mutantes de nemátodo**

## Pruebas comportamentales

### Test de locomoción radial

Esta prueba se realizó siguiendo el protocolo descrito por Robatzek y Thomas<sup>538</sup> con modificaciones. El estudio de locomoción de los gusanos se realizó mediante la colocación de 15-30 gusanos por placa en etapa L4-adulto en una placa NGM agar de 15 cm de diámetro a 20°C. Estas placas presentan una capa de bacterias uniformemente distribuida para evitar preferencias de desplazamiento en los gusanos. Una vez alcanzados los tiempos indicados, se marcó la localización de los gusanos en la placa y se midieron las distancias recorridas desde la posición inicial. Se ensayaron >90 animales por cada grupo experimental.

### Obtención de muestras

Para la obtención de muestras de gusano, se procedió a sincronizar la puesta de huevos con el fin de tener gusanos de la misma etapa de desarrollo. Para ello, se sembraron placas 20 cm de diámetro con poblaciones mixtas de gusanos y se incubaron 3 días a 15°C hasta obtener placas superpobladas. Una vez alcanzado este momento, se procedió a la extracción de huevos de los especímenes más adultos. Para ello, se lavaron las placas en tampón M9 con sucesivos lavados para recoger el máximo de gusanos posible por placa. A continuación, centrifugaron las muestras para decantar a los animales

y se trató este precipitado con una solución de lejía e hidróxido de sodio para favorecer la disolución de las cutículas. Tras un periodo de incubación de 5 minutos y controles periódicos bajo el microscopio, se lavaron las muestras y se centrifugaron. La cutícula de los huevos es más resistente a esta solución, por lo que en esta incubación quedaron intactos. Tras tres lavados para eliminar los restos de lejía, se procedió a la siembra de huevos en las placas. En el caso del material recogido en etapa de desarrollo larva L4, se sembraron 10.000 huevos por placa, mientras que en las placas destinadas a ser recogidas en la etapa de desarrollo comprendida entre L2-L3 se sembraron 25.000 huevos por placa. Una vez alcanzada la etapa de desarrollo de interés, se procedió a la recogida de muestras. Para ello, se lavaron las placas con tampón M9 para arrastrar a los gusanos a un tubo Falcon. Tras 4 lavados, se recogió el pellet de gusanos en un tubo eppendorf y se congeló directamente en nitrógeno líquido hasta su utilización.

## Técnicas bioquímicas

### Preparación de muestras

1. Extracción de ARN: El procedimiento de extracción de ARN seguido en este caso es el mismo detallado anteriormente, con una proporción de 1ml de trizol por cada 100ml de pellet de gusanos aproximadamente.

### RT-PCR

Para determinar los cambios en la expresión génica se realizó un análisis en los niveles de ARNm de los diferentes marcadores de interés (**Tabla 17**) mediante la técnica de RT-PCR. El ARN aislado de las muestras se cuantificó mediante la medida de absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro Nanoprotometer Small-volume Spectrophotometers (Wastburg) y se comprobó su pureza mediante la relación de absorbancias entre 260/280nm. Una vez seleccionada la cantidad de ARN total para llevar a cabo la reacción (1 µg en este caso), se sometió a las muestras a un proceso de retrotranscripción mediante el kit comercial iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, CA, EEUU).

Una vez obtenido el ADNc se realizó el ensayo de amplificación en placas de 96 pocillos en un volumen final de 20 µl. Para ello, se utilizaron el reactivo comercial iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, CA, EEUU) y las sondas diseñadas para cada gen. Para cada gen se elaboró una curva patrón de concentraciones conocidas de ADNc (1; 10 y 100 ng) de una muestra control para validar nuestras sondas. De cada sonda de interés se pipetearon duplicados con una concentración de 10 ng por pocillo. Como control de normalización se utilizaron los niveles de dos genes, la β-actina (*act-1*) y el ortólogo de la proteína ribosómica humana L32 (*rpl-32*). Además, como control interno de la técnica, en cada ensayo se incluyeron tanto pocillos con muestras RT-, como pocillos de sonda sin muestra (para identificar posibles artefactos en la emisión fluorescente). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, CA, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados se analizaron mediante el software CFX Maestro™ Software for CFX Real-Time PCR Instruments (Bio-Rad, CA, EEUU) y los niveles de expresión fueron calculados por el método de la segunda derivada o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  <sup>534</sup>.



| Gen                                | Ortólogo humano  | Forward               | Reverse               |
|------------------------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| <b>SISTEMA ENDOCANNABINOIDE</b>    |  |                       |                       |
| npr19                              | CB <sub>1</sub> /CB <sub>2</sub>                             | ATACCAGGGAGACCACGAAA  | GGGCGAACTTCCTCAGTTAG  |
| npr24                              | GPR18  | ATGGTGTCTGACCGCACTTA  | CAACGGCAAGGTTGAATATG  |
| npr32                              | GPR55  | GAACGAAGTTCCCGATTGAT  | GTTTCATGGATGACTCCAG   |
| npr35                              | Neuropéptidos  | GAGGTAACCAGCAACAAGCA  | AGCCCCGAGAAGATCGAGTAA |
| faah1                              | FAAH-1   | TCAGTTCCGATTCCAATCAA  | GGGTGGAGAAGGTGCTCTTA  |
| faah2                              | FAAH-2   | AACCGGACAAAGAAGAGCAT  | GTGAAATGGCTGGATTGATG  |
| faah3                              | FAAH-3   | GTGCATTTGACGCATTCTT   | CGTAGGGAACGCCAAATTAT  |
| nape1                              | NAPE-PLD   | ATGGTCTTCCCGTTCTTCAC  | CACAAACCTGAACCCTCAAA  |
| nape2a                             | NAPE-PLD   | GGCAGATCCTCCAACCTCAT  | TGCTGGACCGAAGAGATACA  |
| nape2c                             | NAPE-PLD   | GGCAGATCCTCCAACCTCAT  | TGCTGGACCGAAGAGATACA  |
| dagl2b                             | DAGL   | AGCAACACGCATTGAATGAT  | CGCGTTTGCTGGTTTAGTTA  |
| ocr2a                              | TRPV5  | TTCGCTTCCAGCAATGTATC  | GCTTACCCACTGGCAAAGAT  |
| osm9                               | TRPV5  | GCTTGTTCCGGTACCCACTTT | GGCTCATCTGGAATGGAAGT  |
| trpa1                              | TRPA1  | CAGCGACTCGAAAGATTGAA  | TCATTAGGGCTTGATGTTCTG |
| nhr85a                             | PPARY  | CATTCGTGCTTTCTCACGTT  | AAGACTGCCTGATCCTTCGT  |
| nhr85b                             | PPARY  | GCAGCTACTGGAGCAATCAG  | GCTCGGAGGTATCCAATCAT  |
| <b>SEÑALIZACIÓN MONOAMINÉRGICA</b> |  |                       |                       |
| ser4                               | 5HT <sub>1A</sub>  | GCACATCCGTTTGATGATTC  | GGCTGGGTTACCTAAACTCG  |
| mod5                               | SLC6A4   | AGCAGACTGCAATCATTTCTG | GCTATGGTGGTCAATTCGTG  |
| tph1α                              | Triptófano hidroxilasa (TPH1)                                | CAGCCCTGCTCCATACATAA  | GATCTGATGATGCGACAACC  |
| <b>FUNCIÓN MUSCULAR</b>            |  |                       |                       |
| myo3                               | MYH6 y MYH7  | GCTGATGCACGAATCTTGTT  | TTGAGGAGGCTGAGGAAGTT  |
| hlh1a                              | Factor miogénico 5 y 6 (MYF5/6)                              | GAGTTGTTCGTCGGTCATTG  | TCGGACGACGATAGAGATCA  |
| dys1a                              | Distrofina (DMD)   | GTCCCGGAAGGAAGATGTAA  | GAAGCCATCAAACAATGGTG  |
| dyb1                               | distrobrevina α (DTNA)                                       | TTGACGTGGCAGGAATACAT  | CAGCTATAAATCGCCGACAA  |
| act1                               | β-Actina (ACTB)  | CGTGCTCAATTGGGTACTTG  | CGGTATGGGACAGAAGGACT  |
| pxl1                               | Leupaxina (LPXN), paxilina (PXN) y<br>TGFB111                | TTGAAAGAAACTCCGCAATG  | TTGCAAACGTGACTTCTTCC  |
| clp1                               | Calpaina 9 (CAPN)  | CAGGATCCGAATCGGTAAGT  | TGGAGGATGCAGGAATTACA  |
| clp4                               | Calpaina 9 (CAPN)  | CCGTTCCATTCTTCTCATT   | GCCAACATCAAAGAAGCTCA  |
| slo1                               | KCNMA1   | GAATCCTGATCAGCGAACAA  | CCATCCCGTAACCTAGAGGA  |
| unc54                              | MYH6 y MYH7  | TTGGTTCTCGTGGTTCATGT  | ACGAGCAAGGTGGAGCTACT  |
| snf6                               | SLC6A14  | TTCGGAATTGTGTTGTTCTG  | GGAAGAAATGCCAATGTCCT  |
| ace1                               | Acetil colinesterasa (AChE)/ Butiril<br>colinesterasa (BChE) | TTTGTGCTTCCAAACCAAA   | CGTATTTGCCGAATTTGATG  |

**Tabla 17. Genes estudiados en los modelos experimentales de *C. elegans*.** .SLC6A4: transportador de solutos de la familia 6 miembro 4. Recaptura de serotonina; TGFB111: factor de crecimiento transformante β1 inducido por el transcrito 1; KCNMA1: Canal de potasio activado por calcio. Implicado en los procesos de organización del sarcómero; MYH6 y MYH7: myosin heavy chain 6 y 7; SLC6A14: transportador de solutos de la familia 6 miembro 14. Transportador de acetilcolina.

## Microscopía

Para la observación estructural del músculo esquelético, utilizamos gusanos con la proteína MYO3 marcada con rojo fluorescente. Para el montaje de las muestras utilizamos un protocolo previamente descrito<sup>539</sup> con modificaciones. Preparamos portaobjetos con una fina y homogénea capa de agarosa al 2%. Para inmovilizar a los gusanos se utilizaron 5-10 µl de azida sódica a una concentración de 500 nM. Al entrar en contacto con la azida, los gusanos quedan inmóviles y listos para ser observados al microscopio. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Nikon Eclipse TE300 de epifluorescencia con una cámara photometrics SenSys cooled CCD camera y el software IPLab image acquisition software (BD Biosciences Bioimaging). Las imágenes fueron descodificadas usando un MicroTome deconvolution software (BD Biosciences Bioimaging).

## Tratamiento farmacológico

Una vez adquirido el compuesto AEA disuelto en etanol se procedió a la realización de alícuotas correspondientes a cada día de tratamiento y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

### Preparación de las placas de tratamiento

Para los tratamientos farmacológicos se utilizaron placas de 3 cm de diámetro con un volumen de NGM agar preparadas los días previos al experimento. Primero, se pipetearon 3ml de NGM y se dejaron solidificar. Una vez solidificadas todas las placas, se sembraron con 200µl de OP50 y se dejaron secar toda la noche. Con el fin de evitar que la capa de bacterias de las placas metabolizara los compuestos, se sometieron a dos rondas de radiación ultravioleta durante 10 minutos. Una vez preparadas las placas, siempre en condiciones de esterilidad, se añadieron 100 µl por placa de las correspondientes concentraciones (0.5; 25; 75; 250 µM) de AEA disuelta en etanol.

Una vez preparadas las placas, se sembraron alrededor de 100 gusanos por placas en un total de 3 placas en estado L2-L3 de desarrollo. El ensayo farmacológico se repitió durante 3 días consecutivos. Los animales se mantuvieron en las placas de tratamiento durante 48h y posteriormente fueron recogidos para la obtención de muestras para los análisis bioquímicos.

# Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en este trabajo se presentan como valor medio  $\pm$  error estándar (SEM) ( $n \geq 6$ ) y se analizaron con el programa informático GraphPad Prism (La Jolla, CA, EEUU). En función de cada experimento, se han utilizado diferentes test estadísticos. Las comparaciones de múltiples grupos se analizaron, siempre y cuando las poblaciones pasasen los diferentes test de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino and Pearson y Shapiro-Wilk), con el análisis de la varianza ANOVA de una o dos vías, seguido de un test post hoc, que en nuestro caso fue o el test de Newman-Keuls o con corrección de Bonferroni, respectivamente. En el caso de poblaciones que no se ajustan a una distribución normal, se utilizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de un test de Dunn. En el caso de comparaciones de dos muestras experimentales independientes se sometió a los datos al test de la  $t$  de Student de una o dos colas, con una corrección de Welch cuando las varianzas no eran iguales. Por último, el análisis de las curvas de supervivencia se realizó mediante el test de contraste de hipótesis de Log-Rank. En todos los casos, se consideran estadísticamente significativos los contrastes de hipótesis con una  $p < 0.05$ . El análisis empleado, así como el tamaño muestral en cada caso se detallará en la leyenda de cada figura.







# RESULTADOS

---





# Diseño experimental 1: Estudio del papel del receptor CB<sub>2</sub> en la fisiopatología de la ELA.

El primer objetivo en esta Tesis Doctoral ha sido evaluar el potencial del receptor CB<sub>2</sub> frente al desarrollo de los eventos patogénicos de la ELA. A pesar de que este receptor ya ha sido estudiado como posible diana farmacológica en el modelo de ratones mutantes para SOD1<sup>433,461</sup>, en esta Tesis Doctoral hemos utilizado un modelo experimental de ELA basado en la inserción de la proteína humana mutada TDP43<sup>A315</sup>, un modelo basado en uno de los nuevos genes relacionados con la ELA, que mimetiza parcialmente los signos y síntomas motores que se desarrollan durante el transcurso de la patología en humanos, y que nos permite monitorizar el proceso degenerativo que sufren los animales.

Para llevar a cabo este objetivo, se han utilizado dos aproximaciones experimentales diferentes:

Primero, mediante la activación farmacológica del receptor con un agonista selectivo. Numerosos trabajos han identificado una sobreexpresión de este receptor durante el transcurso de la patología en los pacientes<sup>185,460,512</sup>, así como en modelos animales, incluido el modelo utilizado en este trabajo. Este hallazgo se ha interpretado como una respuesta endógena frente al daño que se está produciendo, hipótesis demostrada en otras END<sup>185,460,512</sup>. El receptor CB<sub>2</sub> está implicado en la regulación de los procesos inflamatorios, y uno de los principales eventos observados en esta enfermedad es la neuroinflamación crónica. Por lo tanto, la activación farmacológica de este receptor debería favorecer la limitación de los eventos inflamatorios que se desarrollan en la ELA.

En una segunda estrategia, hemos querido evaluar el alcance de la influencia de este receptor en la progresión de la enfermedad. Para ello, por un lado, hemos bloqueado farmacológicamente este receptor con antagonista una vez iniciado el debut de la patología. Por otro lado, como segunda estrategia para profundizar en el conocimiento del papel que tiene el receptor en la ELA, generamos un ratón mutante para TDP43 pero que además carece genéticamente del receptor CB<sub>2</sub>.

## 1. Activación selectiva del receptor CB<sub>2</sub> mediante el tratamiento de los ratones TDP43<sup>A315T</sup> con el agonista HU308

Como se acaba de mencionar, la hipótesis a investigar es que la sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub> observada en nuestro modelo experimental surge como un mecanismo compensatorio neuroprotector, ya descrito en otras enfermedades con mecanismos patogénicos similares. En base a ello, quisimos evaluar el potencial terapéutico de la activación selectiva de este receptor mediante un potente agonista cannabinoide sintético, el compuesto HU308, selectivo para el receptor CB<sub>2</sub><sup>513</sup>.

Para el desarrollo de este objetivo, llevamos a cabo un tratamiento farmacológico diario durante un periodo de 30 días con el compuesto HU308 y el correspondiente vehículo en el caso de los controles, tal y como se describe en el apartado de Materiales y métodos.

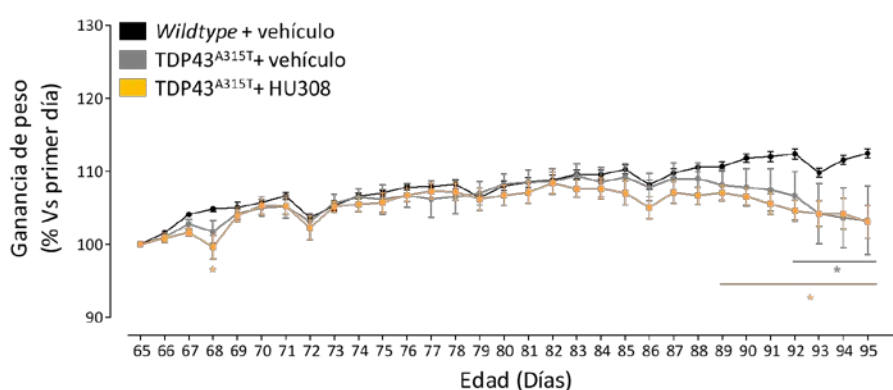
## Evaluación de la progresión de la enfermedad: peso y actividad motora

Durante el tratamiento farmacológico con el agonista HU308, valoramos el estado físico general de los animales mediante controles observacionales y monitorización diaria de peso. De esta forma pudimos evaluar los efectos del tratamiento durante la progresión de la enfermedad en nuestro modelo experimental de ELA, tanto en lo que se refiere a la recuperación de los signos motores típicos de los ratones transgénicos, como en los posibles efectos adversos que el propio tratamiento pudiera mostrar. También evaluamos semanalmente el estatus motor de los animales de los diferentes grupos mediante pruebas comportamentales de coordinación, fuerza y debilidad muscular.

Los ratones transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> presentaron una reducción en el tamaño y peso corporal (Figura 32) desde el inicio del periodo de tratamiento (65 días de edad) al compararlos con los controles tratados con vehículo. Además, mediante test motores pudimos comprobar que nuestro modelo animal presenta un claro deterioro motor, anteriormente descrito, asociado a la presencia de la mutación en el organismo de los ratones. En este caso, al inicio del tratamiento ya se observaron diferencias significativas entre los animales WT y los animales TDP43<sup>A315T</sup> a nivel comportamental, evaluado por la prueba de Rotarod, así como diferencias en la distonía o espasticidad muscular, evaluada mediante la cuantificación del reflejo de clasping (Figura 33). Por lo tanto, este tratamiento se inició en etapas tempranas sintomáticas.

### Análisis de ganancia de peso

Respecto a la ganancia de peso corporal de cada animal respecto al primer día de tratamiento (Figura 32), en fases avanzadas del periodo de tratamiento (89-90 días), todos los animales transgénicos, con independencia del tratamiento, vieron reducida su ganancia de peso de manera significativa con respecto a los animales WT. El tratamiento con el agonista CB<sub>2</sub> HU308 no ejerció ninguna efecto importante en el parámetro de ganancia de peso, ya que no se observaron diferencias significativas con respecto a los animales transgénicos tratados con

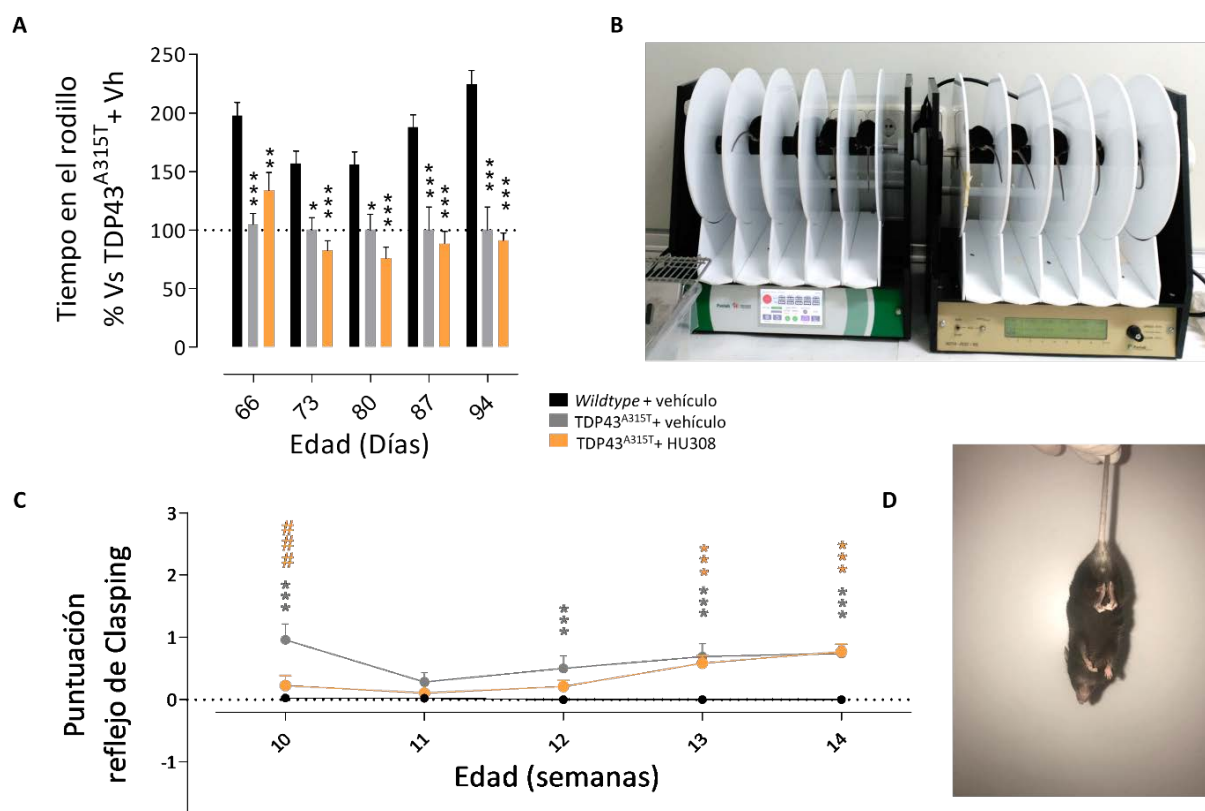


**Figura 32. Control de ganancia de peso diaria durante el periodo de tratamiento.** Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM del porcentaje de peso respecto al peso inicial de cada grupo experimental (n=8-15). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para valores repetidos, seguido de un test de Bonferroni. \*p<0.05 (\* respecto a los animales WT+vehículo). Todos los ratones transgénicos muestran una reducción en la ganancia de peso corporal en etapas avanzadas de la enfermedad.

vehículo, pero tampoco se apreció una pérdida de peso, lo que indica que el tratamiento no tuvo efectos adversos evidentes. Los datos estadísticos se muestran en el **cuadro S1** del Material suplementario.

### Estudio de la funcionalidad motora

La evaluación de la función motora de los animales se realizó mediante el test de Rotarod y la evaluación del reflejo de claspings (**Figura 33**). En ambos casos, se evidenció un deterioro progresivo en el estado y la función muscular, reflejada en la habilidad y fuerza para mantenerse en el rodillo, en los animales portadores de la inserción de la proteína humana mutada TDP43<sup>A315T</sup>. El tratamiento con HU308 no mejoró el tiempo de permanencia en el rodillo en el test de Rotarod (**Figura 33-A**). Sin embargo, sí observamos un efecto beneficioso retrasando la aparición de los signos de distonía y espasticidad en los animales transgénicos administrados con este compuesto (**Figura 33-C**).



**Figura 33. El tratamiento con HU308 retrasa la aparición de distonía y espasticidad en los animales TDP43<sup>A315T</sup>** (A) Evaluación de la fuerza y coordinación motora mediante el test de Rotarod. Los valores graficados se representan normalizados frente a la media del primer día del grupo TDP43<sup>A315T</sup> + vehículo. Se representa la media de permanencia en el rodillo cada día de prueba  $\pm$  SEM (n=8-15). Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de dos vías de valores repetidos seguido de un post test de Bonferroni. (C) Evaluación del reflejo del claspings en las extremidades posteriores. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM (n=8-15). Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA seguido de un post test de Bonferroni. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 (\* respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+WT). (B)(D) Imágenes representativas tomadas durante ambos test comportamentales.

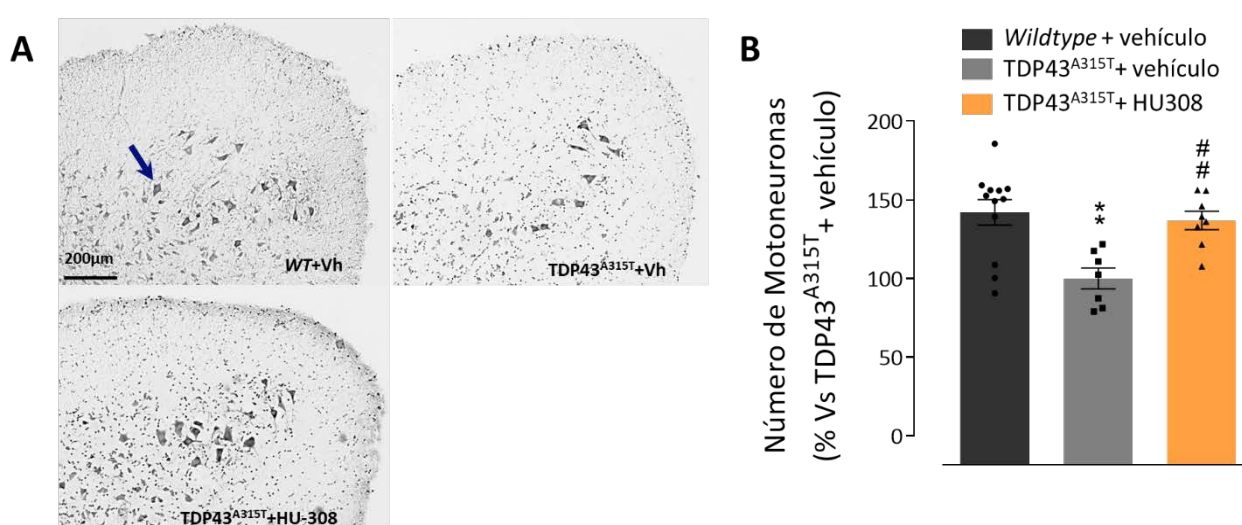
## Determinación de daño celular

Una vez finalizado el tratamiento, los animales fueron sacrificados para proceder al análisis de la estructura más afectada en esta patología, la médula espinal.

El análisis se centró en dos eventos principales, la degeneración neuronal y la neuroinflamación a ésta. Por ello, evaluamos la supervivencia de las MNs en la médula espinal y la respuesta glial asociada, debido a que la expresión del receptor CB<sub>2</sub> está estrechamente relacionada con los procesos inflamatorios y la activación glial. Se analizaron para este fin muestras de la sección comprendida entre las zonas L4-L6 de la médula espinal, ya que es en esta zona lumbar de la médula espinal donde se concentran la mayor parte de las alteraciones histológicas presentes en este modelo animal.

### Estudio de la supervivencia neuronal

Para la cuantificación del número de MNs utilizamos la técnica de la tinción de Nissl, ya que esta tinción permite identificar los cuerpos neuronales de las MNs gracias a su gran tamaño y forma específica, de modo que se pueda contabilizarlas manualmente (Figura 34).

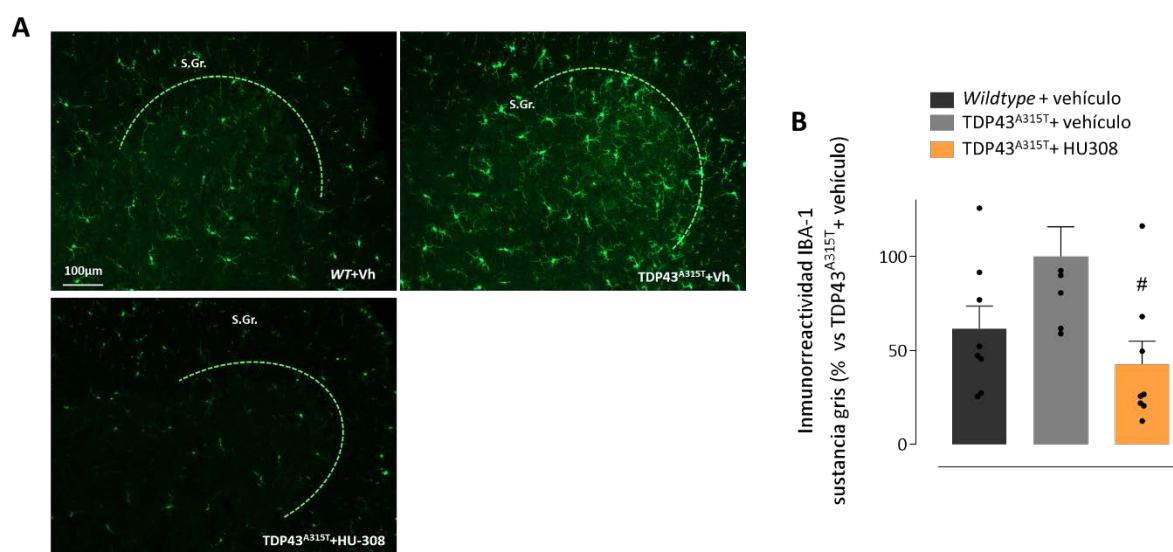


**Figura 34. La activación farmacológica del receptor CB<sub>2</sub> previene la pérdida de MNs en la médula espinal.** (A) Imágenes representativas de la tinción con violeta de Cresilo en el asta ventral de la médula espinal en etapas avanzadas de la enfermedad. (B) Contaje de MNs marcadas por la técnica de Nissl. Los datos representados corresponden a la media de los porcentajes de cada grupo ± SEM con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>. ((n=8-12). Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*\*p<0.0.1. (\* respecto a los animales WT+vehículo; # respecto al grupo experimental TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo).

Como cabría esperar por los resultados obtenidos en la caracterización del modelo<sup>525</sup>, los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo presentaban una pérdida significativa de las MNs de la zona ventral de la médula espinal en los niveles estudiados (L4-L6). El tratamiento farmacológico con HU308 fue capaz de prevenir esta muerte neuronal, ejerciendo un papel neuroprotector de las MNs.

### Estudio de la activación glial

Como ya se ha indicado, en la ELA se produce una activación continuada de las células de glía que contribuye a la patogénesis de esta enfermedad. Por ello, realizamos un estudio sobre el efecto que produce la activación crónica del receptor CB<sub>2</sub> en las poblaciones de células microgliales y astrocitarias, en la zona adyacente a las poblaciones de MNs del asta ventral de la médula espinal (zona dorsal L4-L6). En el caso de la microglía, analizamos mediante inmunofluorescencia el marcador IBA-1 (**Figura 35**). Los animales transgénicos tratados con vehículo presentaron un incremento evidente de la inmunorreactividad para IBA-1 con respecto a los controles, lo que puede implicar tanto un incremento en el número de células de microglía en estos tejidos, como en la inmunorreactividad en cada célula, en ambos casos confirmando la reactividad microglial que se produce en esta zona en la ELA. Este resultado observado en los animales transgénicos se

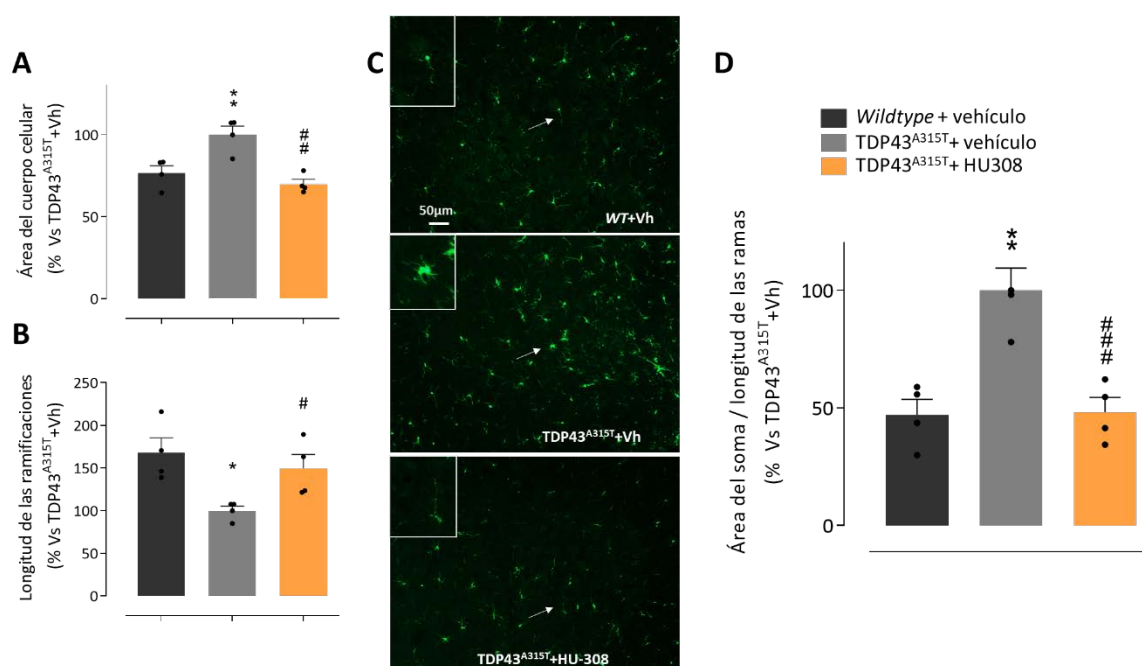


**Figura 35. La activación farmacológica del receptor CB<sub>2</sub> atenúa la activación microglial en la médula espinal. (A)** Imágenes representativas del marcaje inmunofluorescente de IBA-1 de cada grupo experimental. SGr: sustancia gris). **(B)** Cuantificación de la inmunorreactividad para IBA-1 mediante marcaje por inmunofluorescencia en la zona ventral de la médula espinal. Los valores representados corresponden a la media de los porcentajes de cada grupo ± SEM con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> (n=7-8). Los datos se analizaron mediante un test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparación múltiple de Dunn's. \*p<0.05. (# respecto al grupo experimental TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo).

corresponde con los procesos neuroinflamatorios anteriormente descritos que se desencadenan durante el transcurso de esta enfermedad en pacientes<sup>189</sup>. El tratamiento con HU308 redujo significativamente la inmunorreactividad de IBA-1 en esta zona, lo que indica tanto un menor número de células de microglía como un menor nivel de IBA-1 en cada célula.

Para intentar conocer mejor el estado de activación de este tipo celular, llevamos a cabo un análisis adicional de la morfología de las células de microglía (**Figura 36**). Los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo presentaron un incremento significativo del tamaño del soma celular y una disminución significativa en la longitud de las ramificaciones respecto a los animales WT. Esto se evidenció calculando el ratio entre el tamaño del soma con respecto a las ramificaciones en los animales transgénicos de nuestro modelo experimental de ELA, que se incrementó de forma evidente. Este cambio de forma hacia una morfología de tipo ameboide clásicamente se ha relacionado con cambio en el fenotipo de estas células hacia un estado de activación proinflamatorio. El tratamiento con HU308 redujo

significativamente este cambio en la morfología celular de los animales transgénicos, lo que podría implicar una disminución de la activación de las células de microglía en este grupo experimental.

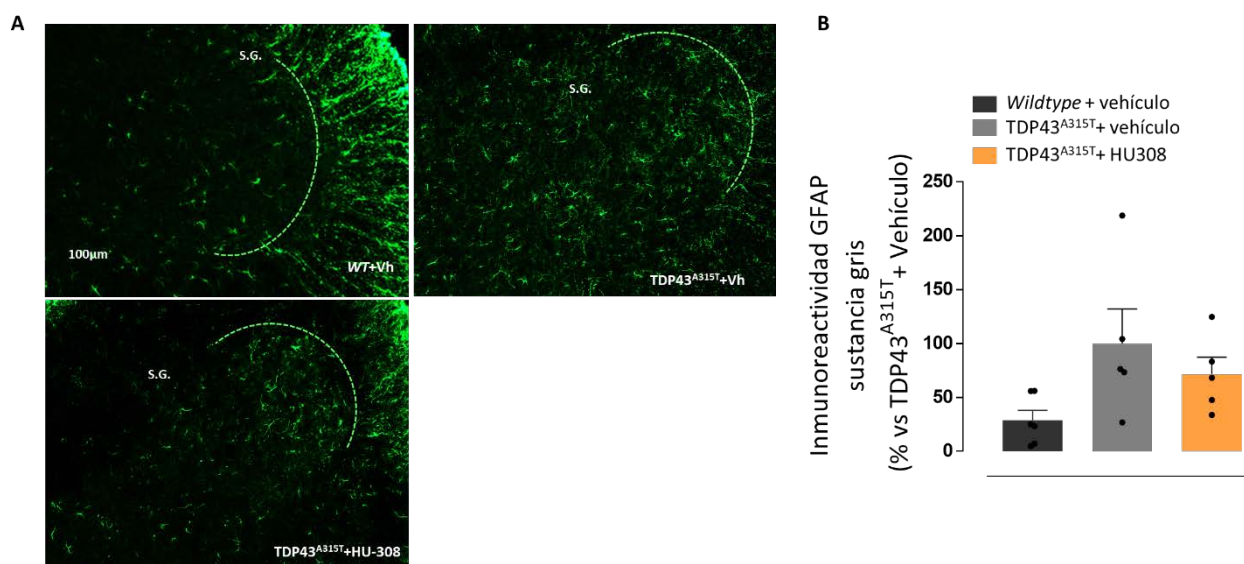


**Figura 36. La administración crónica de HU308 redirige el cambio morfológico de las células de microglía hacia morfología de tipo ramificada.** (A) Medida del área del soma y (B) la longitud de las ramificaciones de las células de microglía de la zona ventral de la médula espinal marcadas con IBA-1. (n=4) (D) Ratio de tamaño del cuerpo celular frente a la longitud de las ramificaciones. Los valores representan la media de la medida de 3 células por grupo experimental  $\pm$  SEM. Normalizado con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>. Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*p<0.05; \*\*p<0.01. (\* respecto a los animales WT+vehículo; # respecto al grupo TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo). (C) Imágenes representativas del marcaje inmunofluorescente de IBA-1 de cada grupo experimental.

Otro de los eventos patogénicos que se producen en la ELA es el incremento de los astrocitos en las zonas afectadas y la hipertrofia de sus procesos celulares, por lo que también quisimos evaluar el grado de astrogliosis en la médula espinal de los animales transgénicos respecto a lo *Wildtype* (WT) y el efecto que ejerce el tratamiento con el agonista CB<sub>2</sub>. Para ello utilizamos el inmunomarcaje con el marcador astrocitario GFAP (Figura 37).

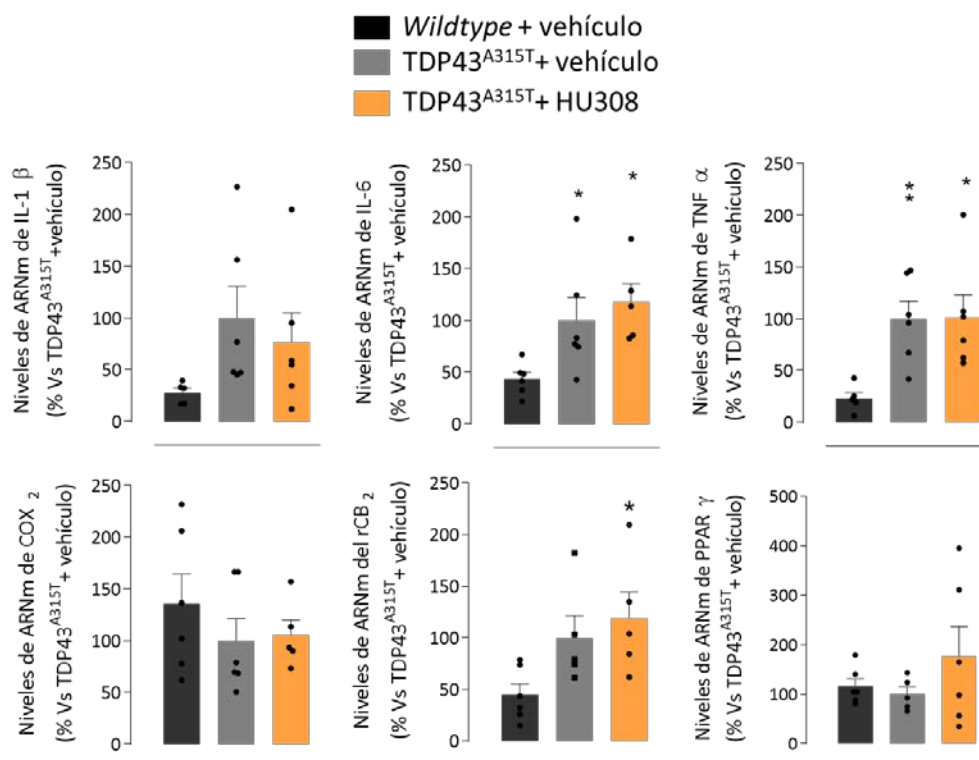
Los animales transgénicos tratados con vehículo presentaron una mayor inmunorreactividad para el marcador GFAP (mostrando un mayor número de astrocitos y/o mayor cantidad de GFAP en cada astrocito) en comparación con los controles WT, de forma similar a lo anteriormente descrito en la caracterización de este<sup>184,462</sup> y otros modelos experimentales de ELA, y con los resultados observados en muestras de tejidos de pacientes. El tratamiento con HU308 tuvo efectos muy modestos sobre la astrogliosis en los animales TDP43A315T al no disminuir el incremento de marcaje GFAP de forma significativa, a pesar de que se puede apreciar una ligera tendencia a disminuir la inmunorreactividad por GFAP.





### Análisis de marcadores inflamatorios

A la vista de las alteraciones gliales relacionadas con la inflamación que encontramos en la médula espinal de los ratones transgénicos y su reversión con el tratamiento con HU308, a continuación, nos propusimos hacer una valoración de los niveles de ARNm de diferentes citoquinas y enzimas proinflamatorias. Además, debido a su implicación en los procesos neuroinflamatorios, evaluamos los niveles de ARNm tanto del receptor CB<sub>2</sub> como del receptor PPAR $\gamma$ . Para ello, seleccionamos tejido procedente de la sección lumbar de la médula espinal de los animales (Figura 38). Los resultados obtenidos en los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias en nuestro modelo experimental van en consonancia con la activación glial observada por técnicas inmunohistoquímicas, ya que observamos un incremento en la expresión de las citoquinas IL-6 y TNF $\alpha$ , y de IL-1 $\beta$ , a pesar de que este último lo hizo de forma no significativa. Sin embargo, el tratamiento farmacológico con HU308 no ejerció ningún efecto sustancial en la reducción de la expresión de las citoquinas evaluadas. En cuanto a la expresión del receptor CB<sub>2</sub>, nuestros resultados muestran una tendencia al alza en el caso de los animales transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo, sobreexpresión previamente descrita por nuestro grupo en este modelo<sup>184</sup>. El tratamiento farmacológico con el agonista selectivo para este receptor incrementó significativamente la sobreexpresión de este receptor. En el caso de COX-2 y del receptor PPAR $\gamma$ , los niveles obtenidos fueron similares en los ratones WT y los transgénicos tratados o bien con vehículo o con el compuesto HU308.



**Figura 38. Análisis de los niveles de marcadores inflamatorios tras la administración crónica de HU308.** Niveles de expresión de ARNm en la zona ventral de la médula espinal. Los valores representados son las medias de cada grupo experimental  $\pm$  SEM (n=6). EL análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \*p< 0.05; \*\*p<0.01. (\* respecto a los animales WT+Vehículo).

## 2. Desactivación funcional del receptor CB<sub>2</sub> en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>

Para profundizar en el estudio del papel neuroprotector del receptor CB<sub>2</sub> en la progresión de la enfermedad, de manera complementaria nos propusimos investigar la situación contraria, es decir, evaluar los efectos de la desactivación funcional de este receptor. Para ello, realizamos dos aproximaciones experimentales diferentes. La primera fue una estrategia farmacológica, donde bloqueamos la acción del receptor utilizando un antagonista selectivo; en la segunda, se generó un modelo animal nuevo, que, además de presentar la expresión de la proteína humana mutada TDP43<sup>A315T</sup>, tenía una delección genética del receptor CB<sub>2</sub>. De esta forma, pudimos evaluar los efectos de la enfermedad en ausencia del receptor CB<sub>2</sub> en este ratón transgénico modelo de ELA.

### 2.1 Bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>

Como hemos indicado anteriormente, llevamos a cabo un bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> en el periodo comprendido entre el inicio de los síntomas motores y el estado terminal de estos animales. Esta estrategia nos permite evaluar el papel que ejerce la activación de este receptor en la etapa sintomatológica de la enfermedad.

Para desarrollar este apartado del Diseño experimental 1, llevamos a cabo un tratamiento crónico con el antagonista/agonista inverso del receptor CB<sub>2</sub>, el AM630, en los animales TDP43<sup>A315T</sup>.



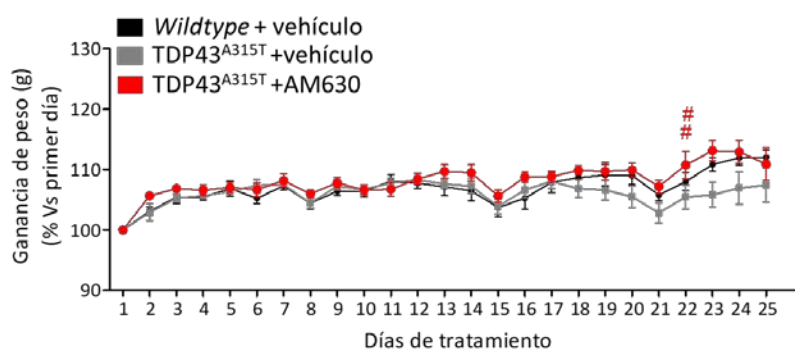
## Evaluación de la progresión de la enfermedad

Nuevamente, llevamos a cabo una evaluación de la progresión de la enfermedad y del tratamiento farmacológico en los animales mediante la monitorización diaria de peso (**Figura 39**) y la realización de pruebas comportamentales semanales (**Figura 40**).

### Análisis de ganancia de peso

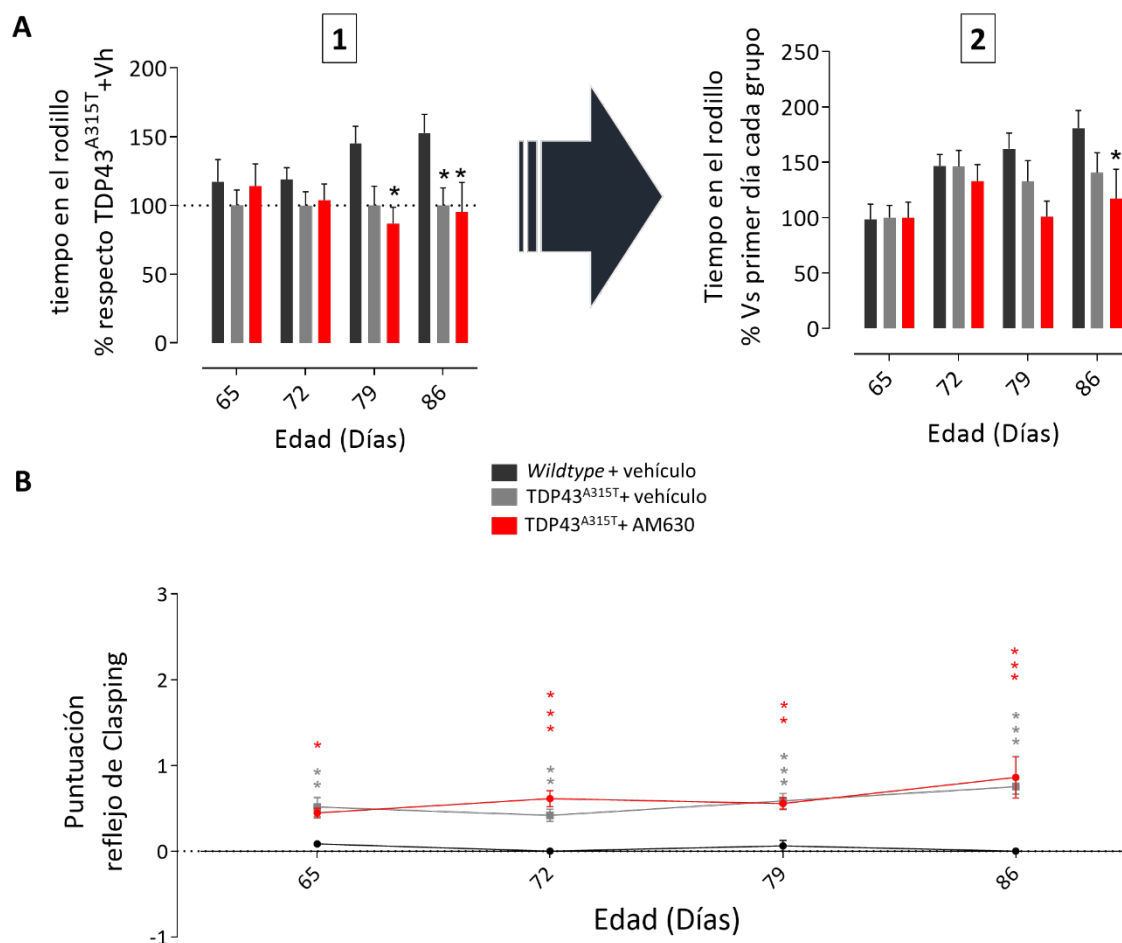
Evaluamos el efecto de la administración del compuesto AM630 sobre el estado general de los animales mediante análisis de ganancia de peso corporal de cada animal respecto al primer día de tratamiento. Observamos como el tratamiento farmacológico con el agonista inverso AM630 no ejerció ningún efecto en el parámetro de ganancia de peso corporal, analizado con respecto a los animales control (**Figura 39**), a pesar de presentar alguna diferencia estadística en algún día aislado durante el periodo analizado.

**Figura 39. El AM630 no alteró la ganancia de peso de los animales durante el periodo de tratamiento.** Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM del porcentaje de peso respecto al peso inicial de cada animal (n=6-10). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para valores repetidos, seguido de un test de Bonferroni. \*\*p<0.01. (# Vs TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo)



### Estudio de la funcionalidad motora

De manera paralela a la monitorización del peso corporal, se realizó semanalmente la prueba de Rotarod y la valoración del reflejo de clamping en todos los grupos experimentales (**Figura 40**). En cuanto al test de Rotarod, los animales transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> tratados con el agonista inverso AM630 mostraron un deterioro en la función muscular tras dos semanas de tratamiento, mientras que en el caso de los animales tratados con vehículo observamos estas diferencias tras la tercera semana de tratamiento (**Figura 4 A-1**). Por lo tanto, si lo comparamos con los animales WT, se observa un adelanto en la aparición de la disfunción motora en aquellos animales transgénicos que además sufren un bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub>. Este efecto aparece de forma más evidente si se calcula el tiempo de permanencia de cada grupo experimental con respecto al primer día de realización de la prueba. En ese caso, solo los animales tratados con AM630 mostraron diferencias con respecto a los animales WT utilizados como control (**Figura 40 A-2**). Además, los animales transgénicos tratados con AM630 mostraron una mayor puntuación en la evaluación del reflejo de clamping tras la primera semana de tratamiento, lo que se relacionaría con una mayor distonía y espasticidad muscular, aunque esta diferencia desaparece con el avance de la patología (**Figura 40-B**).

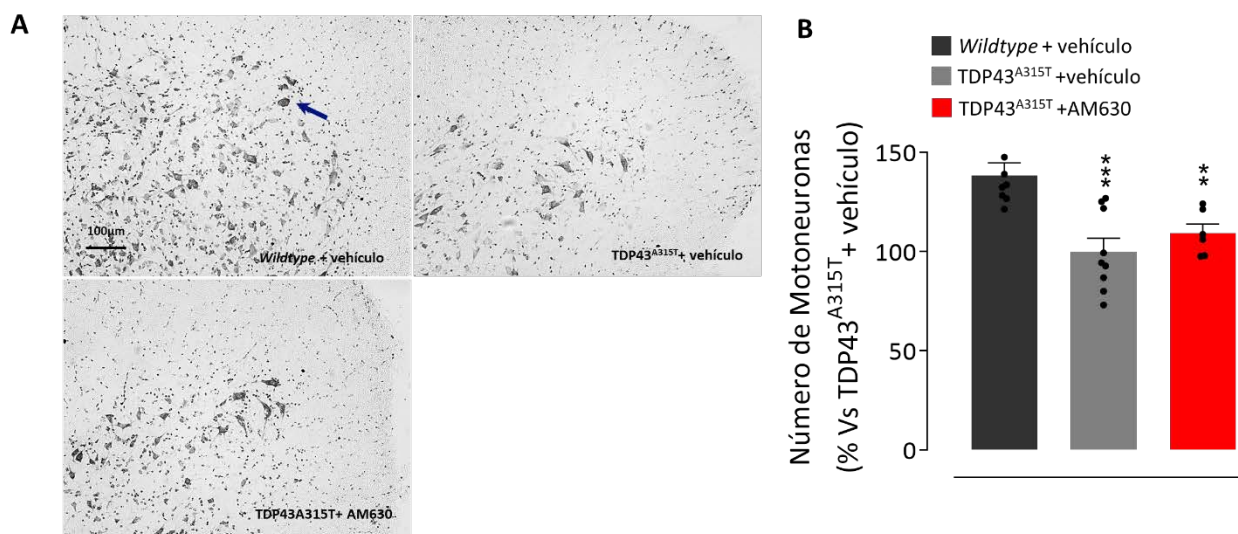


**Figura 40. El bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> acelera y agrava la aparición de los síntomas motores. (A)** Evaluación de la fuerza y coordinación motora mediante el test de Rotarod. Los valores graficados se representan normalizados frente a **(1)** la media de cada día de los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo o **(2)** la media del primer día de cada grupo experimental. Se representa la media de permanencia en el rodillo cada día de prueba  $\pm$  SEM (n=6-10). los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de dos vías de valores repetidos seguido de un post test de Bonferroni. **(B)** Evaluación del reflejo del clasp en las extremidades posteriores. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevo a cabo el análisis de datos mediante un test de ANOVA seguido de un post test de Bonferroni. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 (\* respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo).

## Determinación del daño celular

### Estudio de la supervivencia neuronal

Nuevamente, centramos nuestros análisis de supervivencia neuronal en las MNs de la zona lumbar de la médula espinal de los animales de los tres grupos experimentales. (**Figura 41**). Se observó una pérdida significativa en el número de MNs en los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo comparados con los animales WT. Sin embargo, el bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> en los animales transgénicos no produjo un agravamiento en la muerte de las MNs.

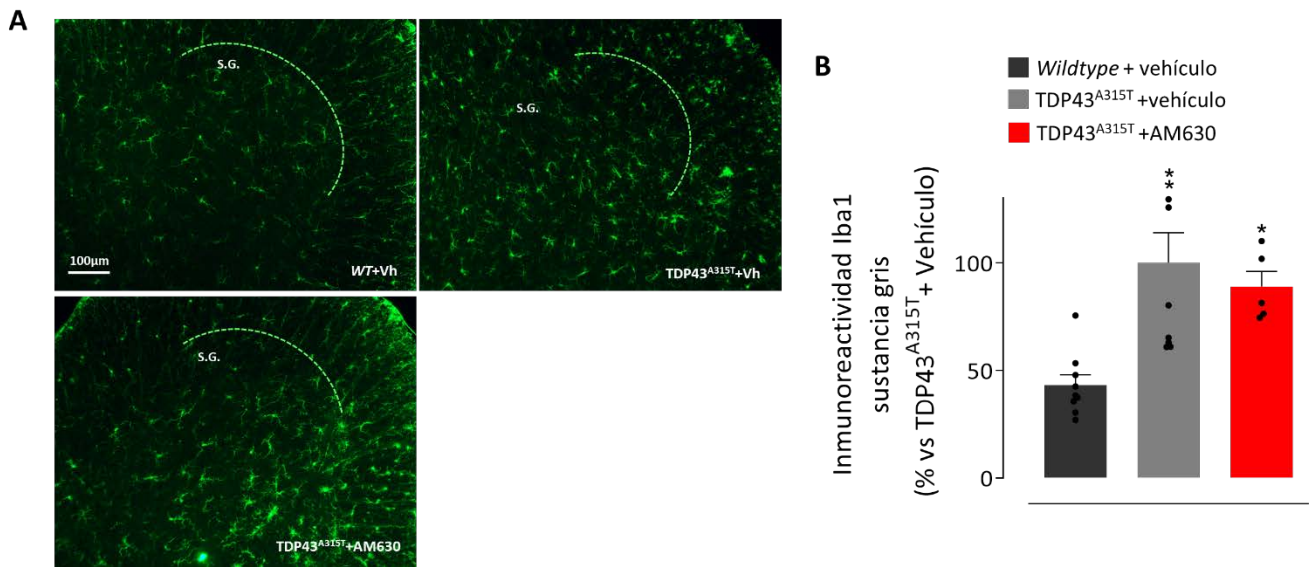


**Figura 41. El bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> no agrava la pérdida de MN en la médula espinal.** (A) Imágenes representativas de cada grupo experimental de la tinción de violeta de Cresilo en la médula espinal. (B) Cuantificación de MNs marcadas por la técnica de Nissl. Los datos representados corresponden a la media de los porcentajes de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo (n=6-9). Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*\*p<0.0.1. (\* respecto a los animales WT+vehículo).

#### Estudio de la activación glial

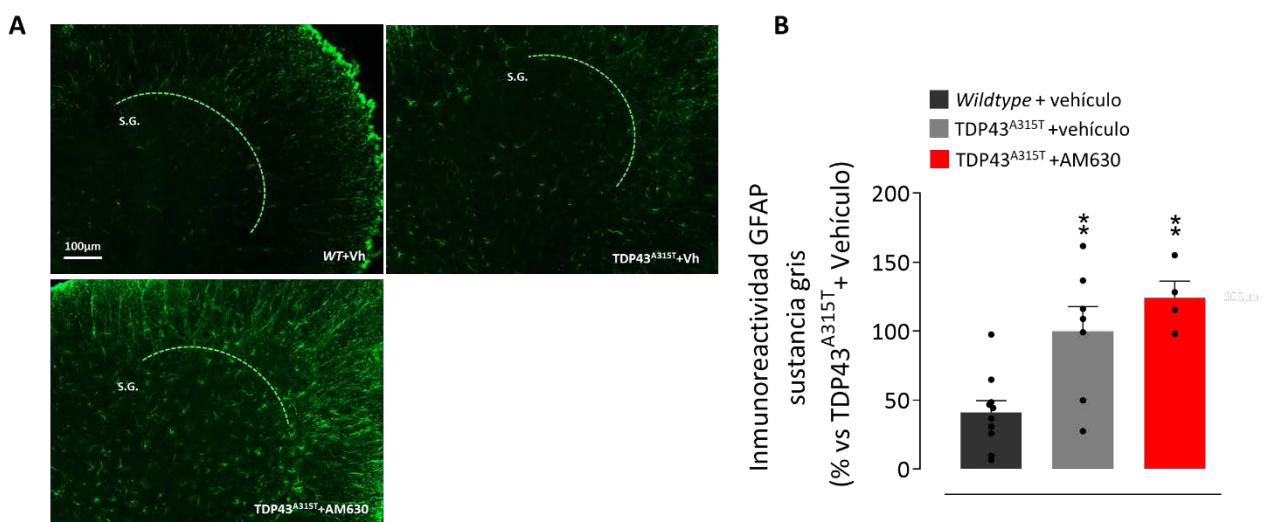
A continuación, evaluamos la activación glial que acompaña a los procesos de muerte neuronal que se dan en este modelo experimental. Para ello, analizamos tanto la microgliosis mediante el inmunomarcaje de células de microglía con IBA-1 (Figura 42) como la astrogliosis, mediante el inmunomarcaje específico de astrocitos con GFAP (Figura 43).

Como en el experimento anterior, observamos un incremento de microgliosis en el asta ventral de la médula espinal en el caso de los animales transgénicos tratados con vehículo. El tratamiento con AM630 en los animales transgénicos sin embargo no causó ningún incremento en la activación microglial en comparación con los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo.



**Figura 42. La administración crónica de AM630 atenúa parcialmente la activación microglial en la médula espinal.** Cuantificación de la densidad de marcaje de inmunofluorescencia para Iba-1. Se representa el porcentaje de los valores medios de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo (n=5-9). El análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . (\* respecto a los animales WT + Vehículo. **(B)** Imágenes representativas del marcaje inmunofluorescente de IBA-1 de cada grupo experimental.

Con respecto a las células astrocitarias, de nuevo se volvió a observar un incremento en la inmunorreactividad para GFAP en los animales transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> con respecto a los animales WT. El tratamiento con AM630 no tuvo un efecto significativo incrementando la activación astrogliar respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo.



**Figura 43. El bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> no altera los niveles de astrogliosis en la médula espinal.** Cuantificación de la densidad de marcaje de inmunofluorescencia para GFAP. Se representa el porcentaje de los valores medios de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo (n=5-9). El análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \*\* $p < 0.01$ . (\* respecto a los animales WT + Vehículo). **(B)** Imágenes representativas del marcaje inmunofluorescente de GFAP de cada grupo experimental.

En los resultados anteriores, observamos que el bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> produce una aceleración del debut de la enfermedad en el modelo experimental de ratón transgénico TDP43<sup>A315T</sup>. Sin embargo, este cambio de fenotipo no se traduce en un agravamiento de la patología, ya que no observamos cambios acusados en etapas finales, cuando realizamos los análisis histopatológicos. No observamos un empeoramiento en la pérdida en número de las MNs, ni tampoco un incremento en la reactividad microglial o astrocitaria.

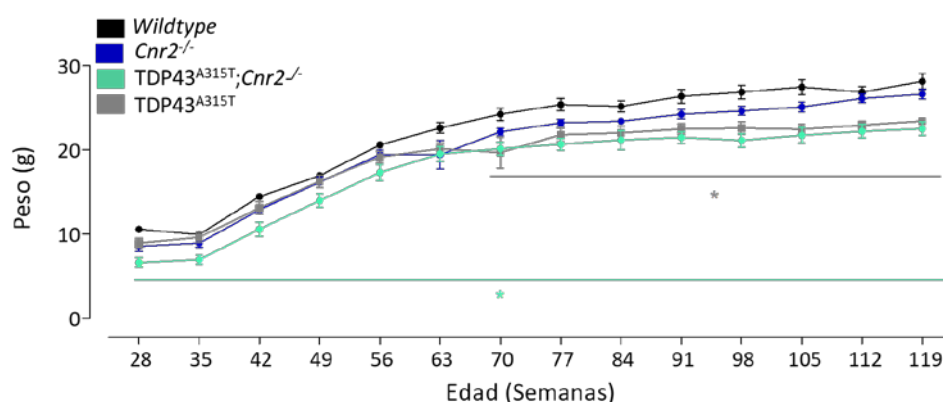
## 2.2 Diseño y caracterización de un modelo experimental doble mutante TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup>.

Para continuar nuestro estudio acerca del papel del receptor CB<sub>2</sub> durante el desarrollo de la patología en el modelo experimental de ELA utilizado en esta Tesis Doctoral, quisimos evaluar la ausencia total del receptor CB<sub>2</sub> en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>, para lo cual generamos un animal doble mutante que además de presentar la inserción de la proteína TDP43<sup>A315T</sup> humana, carecía del receptor CB<sub>2</sub> por ablación genética (animales TDP43<sup>A315T</sup>/Cnr2<sup>-/-</sup>).

### 2.2.1. Efecto del receptor CB<sub>2</sub> sobre el desarrollo normal de los animales

Los animales TDP43<sup>A315T</sup>/Cnr2<sup>-/-</sup> generados por nuestro grupo fueron monitorizados desde el nacimiento mediante controles observacionales, y, a partir de los 28 días de edad, comenzaron los controles semanales de peso (Figura 44).

Observamos menor tamaño corporal en los animales carentes del receptor CB<sub>2</sub> desde el nacimiento, tanto en los ratones transgénicos dobles mutantes (TDP43<sup>A315T</sup>/Cnr2<sup>-/-</sup>) como en los animales Cnr2<sup>-/-</sup>, a pesar de que estos últimos no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales WT. En la Figura 44 presenta la evolución del peso desde el momento de destete. Los animales doble mutantes (TDP43<sup>A315T</sup>/Cnr2<sup>-/-</sup>) mostraron una reducción de peso estadísticamente significativa con respecto a los animales WT desde la semana 28 de edad. Por otro lado, los ratones TDP43<sup>A315T</sup> mostraron una reducción en el peso corporal desde la décima semana de edad, que se corresponde con fases tempranamente sintomáticas descritas en este modelo experimental de ELA. La significancia estadística de la figura 16 se detalla en el cuadro S2.



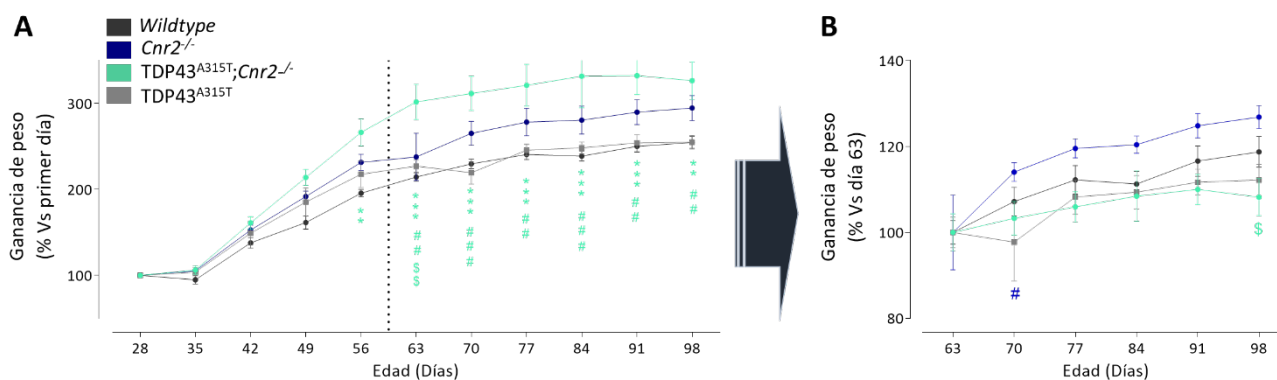
**Figura 44. La ausencia del receptor CB<sub>2</sub> tiene un efecto en el peso corporal de los animales.** Los pesos se representan como la media del grupo  $\pm$  SEM (n=5-7). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para valores repetidos, seguido de un test de Bonferroni. En el cuadro se muestra el grado de significancia de ambos grupos experimentales frente a los animales WT. (\* respecto a los animales WT + Vehículo)

## 2.2.2 Efecto de la ausencia del receptor CB<sub>2</sub> en el desarrollo del fenotipo motor en el modelo TDP43<sup>A315T</sup>

### Evaluación de la progresión de la enfermedad

#### Análisis de ganancia de peso

Mediante el estudio de la ganancia de peso corporal de estos animales (**Figura 45**), comprobamos que la ausencia del receptor CB<sub>2</sub> no pareció ejercer ningún efecto una vez alcanzada la edad adulta madura de los animales, ya que no encontramos diferencias entre ninguno de los grupos analizados en las etapas comprendidas a partir de los 63 días de edad y hasta los 105 días de edad, lo que se corresponde con la etapa sintomática de nuestro modelo de ELA (**Figura 45-B**).



**Figura 45. La ausencia del receptor CB<sub>2</sub> no ejerce ningún efecto en la ganancia de peso de los animales una vez alcanzada la edad adulta (A) Control de ganancia de peso semanal desde el destete y (B) durante el periodo de aparición de la sintomatología motora en nuestro modelo de ELA.** Los datos se representan como la media de cada grupo  $\pm$  SEM (n=5-7). Los valores se han normalizado respecto a la media de peso del día 28 y 63 de cada grupo experimental, respectivamente. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para valores repetidos, seguido de un test de Bonferroni. (\* Vs WT @ Vs TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup> y \$ Vs Cnr2<sup>-/-</sup>)

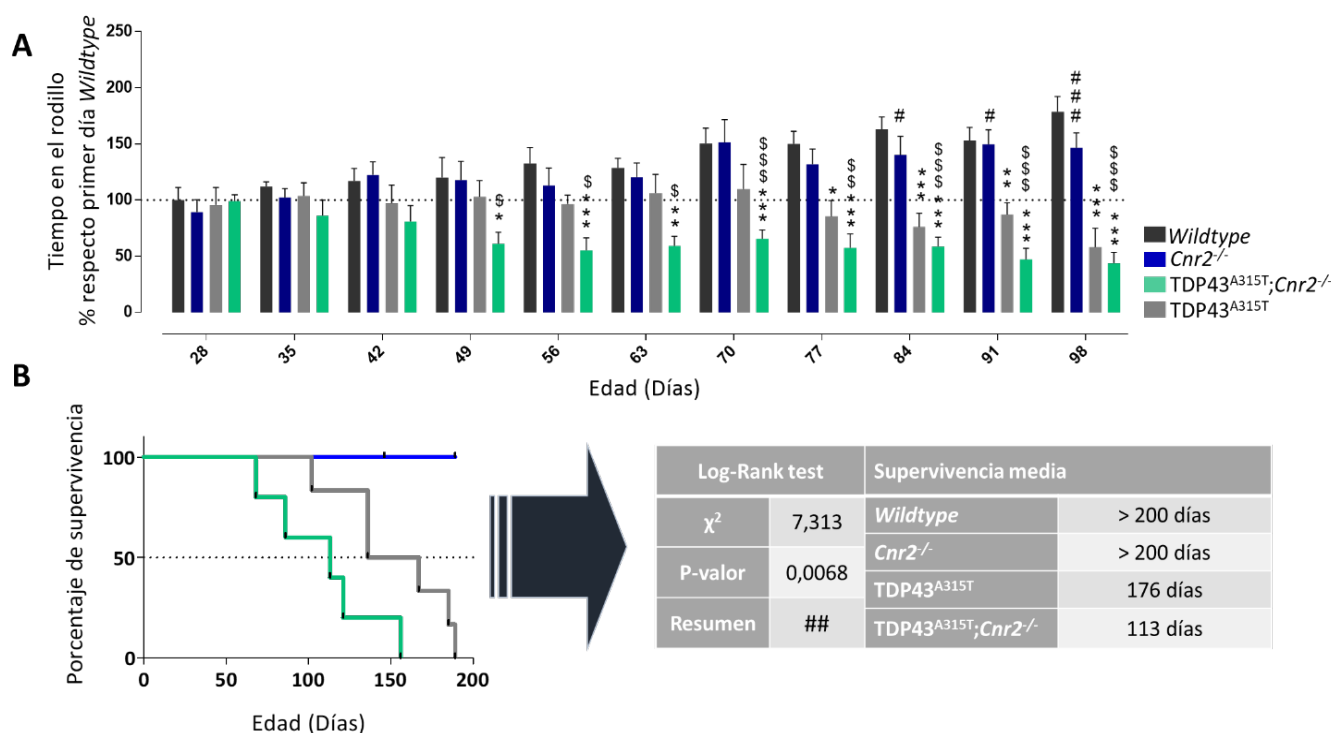
#### Estudio de la funcionalidad motora.

De manera paralela a la monitorización del peso de los animales, se seleccionó una cohorte de animales a los que se le realizó semanalmente la prueba de Rotarod en los 4 grupos experimentales, con el fin de valorar el efecto de la carencia del receptor CB<sub>2</sub> en los parámetros de fuerza y coordinación motora (**Figura 46-A**).

Como esperábamos por resultados previos en este modelo, los animales transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> presentaron una reducción significativa del tiempo de permanencia en el rodillo a partir de la undécima semana de vida (día posnatal 77), analizado respecto a los animales WT. Por otro lado, también observamos cómo los animales dobles mutantes TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup> mostraron una anticipación en la aparición de las alteraciones motoras, que ya fueron apreciables a partir de la séptima semana de vida (día posnatal 49) con respecto a los animales WT, lo que se corresponde con periodos completamente asintomáticos en los ratones transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> con el receptor CB<sub>2</sub> intacto (**Figura 46-A**). Las alteraciones motoras en el Rotarod de ambos grupos de animales transgénicos se igualaron a partir de la duodécima

semana (84 días de edad). Los animales *cnr2*<sup>-/-</sup> no mostraron diferencias con respecto a los animales *WT* durante el desarrollo de la prueba motora.

En un experimento adicional, otro grupo de animales fue seleccionado para la realización de un estudio de supervivencia. Para ello, hicimos un seguimiento de los animales desde el momento de nacimiento a sacrificio compasivo (**Figura 46-B**). En cuanto al estudio de supervivencia realizado en estos animales, observamos que la carencia del receptor CB<sub>2</sub> en los animales transgénicos para TDP43<sup>A315T</sup> produjo una disminución significativa en la supervivencia de estos animales. En la **Figura 46-B** observamos que los animales TDP43<sup>A315T</sup>; *cnr2*<sup>-/-</sup> tienen una supervivencia media en torno a 50 días menor que los animales transgénicos TDP43<sup>A315T</sup>. Los animales *cnr2*<sup>-/-</sup> no presentaron ninguna diferencia en la supervivencia media comparado con los animales *WT*.



**Figura 46. La ausencia del receptor CB<sub>2</sub> en nuestro modelo experimental de ELA precipita la aparición de síntomas motores y reduce la supervivencia en estos animales. (A)** Evaluación de la fuerza y coordinación motora mediante el test de Rotarod. Los valores graficados se representan normalizados frente a la media del primer día del grupo control. Se representa la media de permanencia en el rodillo cada día de prueba  $\pm$  SEM (n=6-10). los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de dos vías de valores repetidos seguido de un post test de Bonferroni (**B**) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier analizada mediante el log-Rank test. \*p<0.5 \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 (\* respecto a los animales WT # respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>).

## Determinación del daño celular

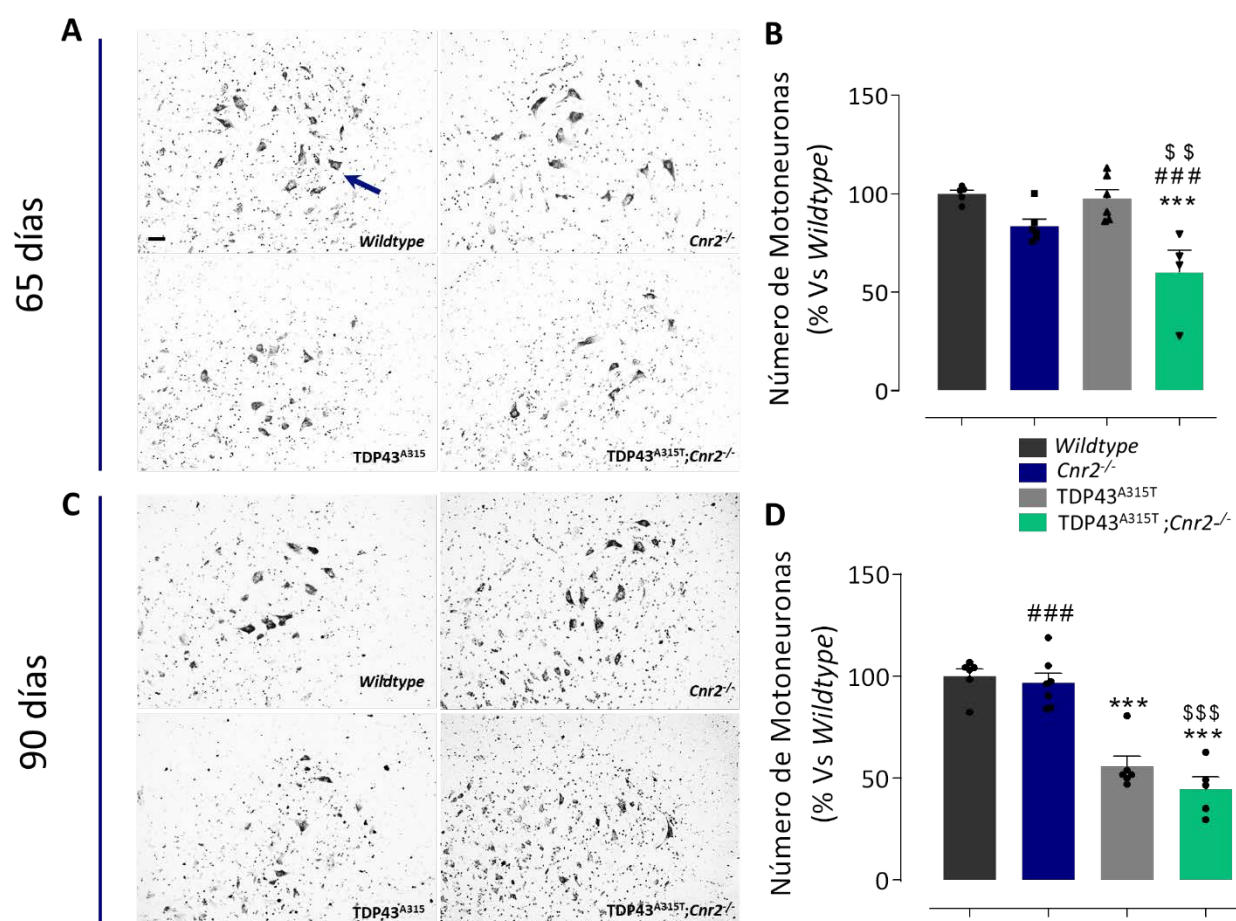
Los animales fueron sacrificados en dos puntos temporales durante la progresión de la enfermedad para proceder al análisis de las estructuras más afectadas en esta patología. Seleccionamos, por un lado, el día posnatal 65 por ser la etapa tempranamente sintomática en el modelo experimental de ELA, y por otro, el día posnatal 90, ya que en este punto temporal la sintomatología de tipo ELA está muy avanzada.



## Estudio de la supervivencia y funcionalidad neuronal

Primero procedimos al estudio de las MNs del asta ventral de la médula espinal en la zona lumbar L4-L6. Para ello, comenzamos realizando una tinción de Nissl de los cuerpos neuronales, para posteriormente corroborar el resultado mediante el inmunomarcaje específico para ChAT, un marcador específico de las MNs que son colinérgicas (Figura 47). Atendiendo a este inmunomarcaje y a la morfología celular tan específica de las MNs, pudimos hacer una valoración cuantitativa específica de las MNs funcionales presentes en el tejido en el momento del sacrificio.

Los animales TDP43<sup>A315T</sup> no presentaron diferencias significativas con respecto a los animales WT en el número de MNs de la zona ventral de la médula espinal (L4-L6) a los 65 días de edad, etapa que se corresponde con estadios presintomáticos o tempranamente sintomáticos en este modelo animal. Sin embargo, sí apreciamos una reducción significativa en el número de MNs (entorno al 50%) en este periodo temporal en los animales transgénicos dobles mutantes, por tanto, carentes del receptor CB<sub>2</sub>. En el segundo punto temporal estudiado (90 días), correspondiente con etapas avanzada de la enfermedad, en la que los animales muestran una marcada disfunción motora, ambos grupos experimentales presentaron una pérdida significativa de MNs respecto a los animales WT utilizados como control. Así, observamos una pérdida de alrededor del 50% en el caso de los animales TDP43<sup>A315T</sup>, y algo más acusada en el caso de los animales dobles mutantes

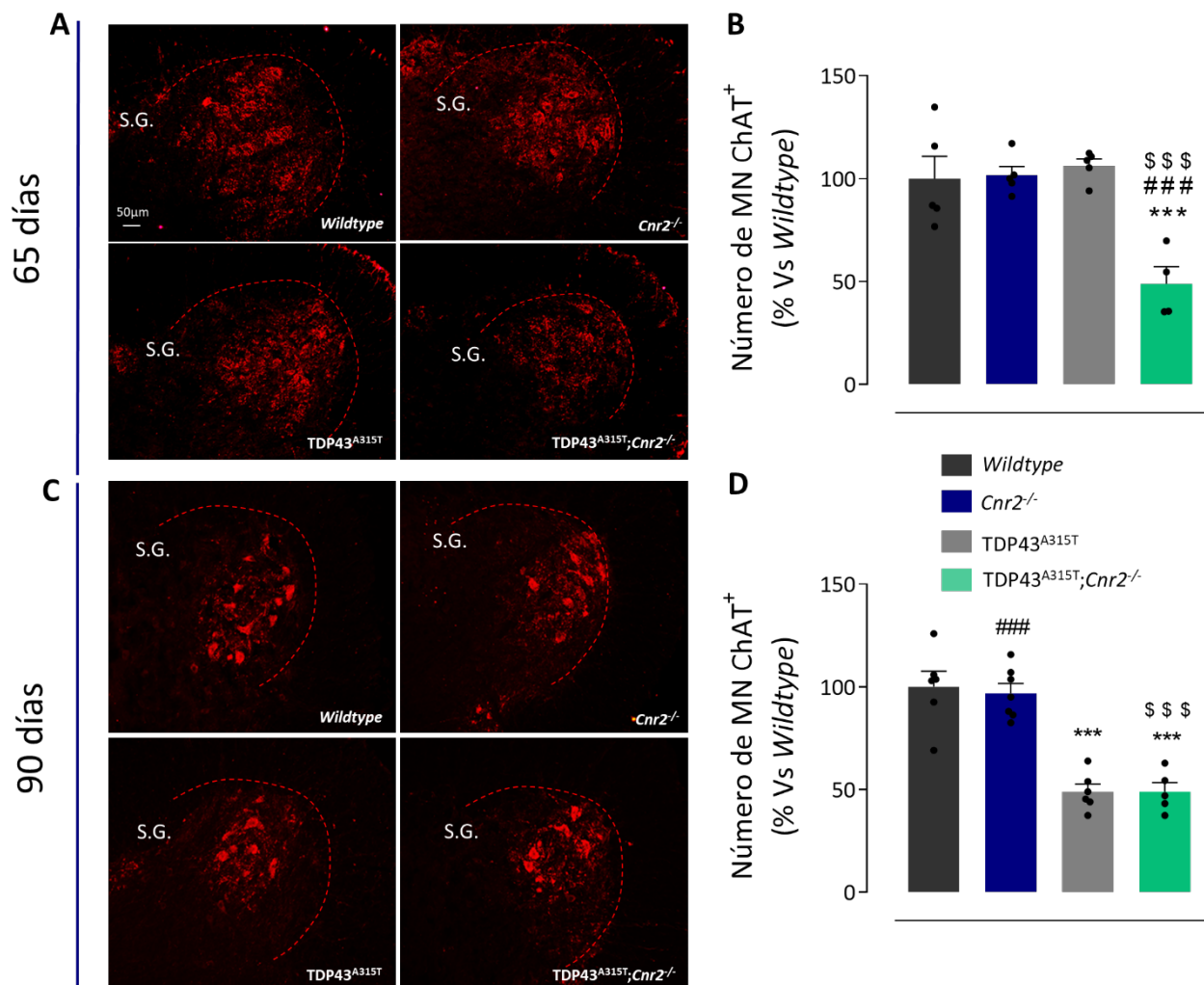


**Figura 47. La ausencia del receptor CB<sub>2</sub> en los ratones TDP43<sup>A315T</sup> acelera la muerte de las MNs (A)(C)** Imágenes representativas de cada grupo experimental de la tinción de violeta de Cresilo a las dos edades analizadas. **(B)(D)** Marcaje de MNs por la técnica de Nissl. Los datos representados corresponden a la media de los porcentajes de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los animales WT. (n=5-7). Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*\*\*p<0.001. (\* respecto a los animales WT+vehículo; # respecto al grupo experimental TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo).



TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup>, aunque no se apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos. La carencia del receptor CB<sub>2</sub> por sí misma no afectó a la supervivencia de las MNs, es decir, no se encontraron evidencias de procesos neurodegenerativos, ya que no se apreciaron diferencias entre los ratones KO-CB<sub>2</sub> Cnr2<sup>-/-</sup> y los WT.

Por otro lado, gracias al inmunomarcaje para ChAT, que permite cuantificar aquellas MNs inferiores positivas para ChAT y da una idea acerca de su funcionalidad (**Figura 48**), permitió confirmar los resultados obtenidos con la tinción de Nissl. A los 65 días de edad, solo los animales TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup> presentaron una reducción significativa en el número de MNs marcadas con el anticuerpo anti-ChAT (ChAT<sup>+</sup>) con respecto a los animales WT tomado como control, así como frente a los animales transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> y los animales cnr2<sup>-/-</sup>. Sin embargo, en estadios más avanzado de la enfermedad (día 90 posnatal), observamos una disminución en el número de MNs ChAT<sup>+</sup> en los animales TDP43<sup>A315T</sup>, hasta situarse a niveles de los dobles mutantes, como observamos gracias a la tinción de Nissl. Los animales TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup> mantuvieron la pérdida neuronal observada en las muestras de 65 días.

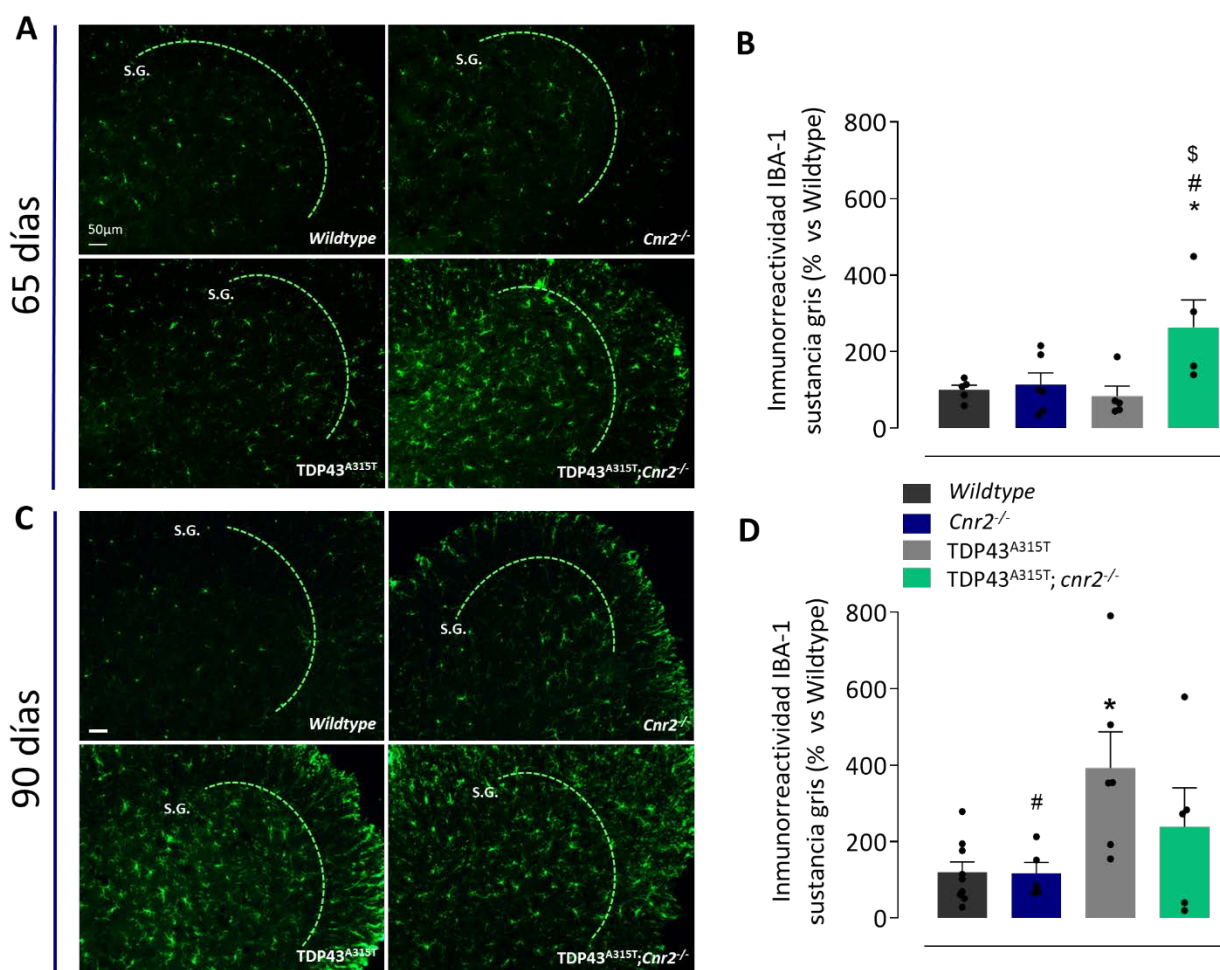


**Figura 48. La ausencia del receptor CB<sub>2</sub> en los ratones TDP43<sup>A315T</sup> reduce el número de MNs positivas para ChAT. (A)(C)** Cuantificación del número de MNs positivas para el inmunomarcaje de ChAT. Los datos representados corresponden la media de los porcentajes de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los animales WT (n=5-7). Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*\*\*p<0.001. (\* respecto a los animales WT +vehículo; # respecto al grupo experimental TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo). **(B)(D)** Imágenes representativas de cada grupo experimental de los niveles de inmunofluorescencia para ChAT a las dos edades analizadas.

Estos resultados, por lo tanto, corroboran los resultados obtenidos mediante la tinción de Nissl, e indican que la ausencia del receptor CB<sub>2</sub> en los ratones transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> acelera el proceso de pérdida de las MN, aunque no implica una mayor pérdida final en estadios avanzados de la enfermedad, al menos en el periodo temporal analizado.

#### Análisis de la activación glial

De manera paralela, realizamos un análisis de la gliosis asociada a los procesos neurodegenerativos en ambos modelos experimentales, tanto en los animales TDP43<sup>A315T</sup> con expresión normal del receptor CB<sub>2</sub>, como en los animales dobles mutantes. Para ello, evaluamos el marcaje por inmunorreactividad para IBA-1 específico de microglía y el inmunomarcaje de GFAP para marcar los astrocitos presentes en la médula espinal de los animales (Figura 49 y 50).

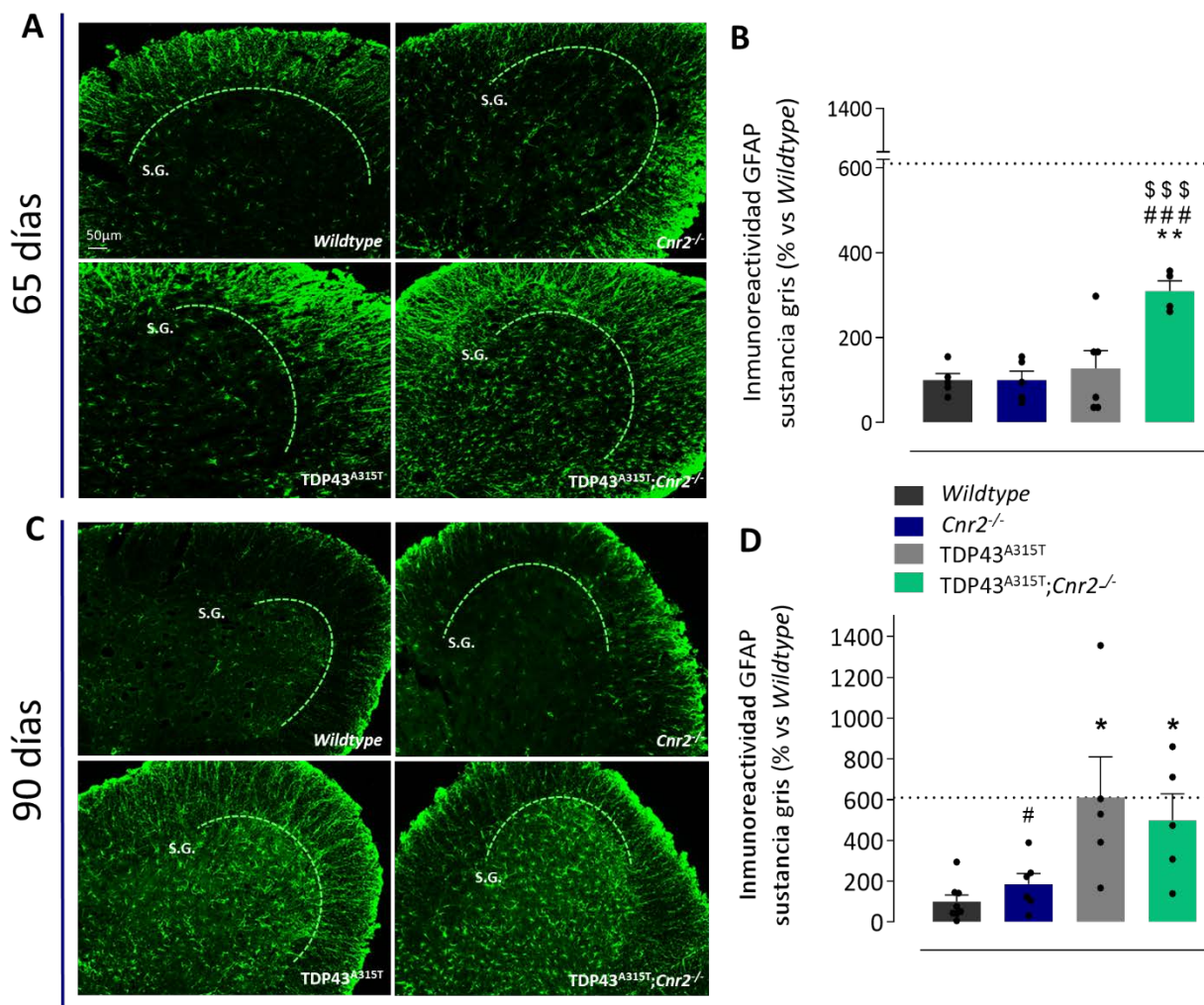


**Figura 49. La delección del receptor CB<sub>2</sub> acelera los procesos de microgliosis en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>** (A)(C) Cuantificación de la densidad de marcaje de inmunofluorescencia para Iba-1. Se representa el porcentaje de los valores medios de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los animales WT (n=5-9). EL análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \*p<0.5. (\* respecto a los animales WT + Vehículo # respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>). (B)(D) Imágenes representativas del marcaje inmunofluorescente de IBA-1 de cada grupo experimental a las dos edades analizadas.

Los animales transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> con expresión normal del receptor CB<sub>2</sub> (modelo experimental de ELA) no mostraron diferencias significativas en el inmunomarcaje para IBA-1 con respecto a los animales WT en estadios presintomáticos o tempranamente sintomáticos (Figura 49-A). Sin embargo, a los 90 días de edad, etapa correspondiente con una progresión avanzada de la enfermedad, estos animales mostraron un incremento significativo de en torno a 3 veces en la

inmunorreactividad para IBA-1, lo que implica un incremento en la microgliosis en estos tejidos con respecto a los niveles observados en los animales *WT* (Figura 49-B). En contraste, se pudo observar un marcado incremento en el inmunomarcaje para IBA-1 en los animales TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup> desde los 65 días de edad, que se mantuvo más o menos constante en el tiempo, como demuestra el incremento observado a los 90 días de edad. De nuevo, los animales Cnr2<sup>-/-</sup> no mostraron diferencias significativas con los animales *WT* utilizados como control.

Una vez analizados los niveles de microglía en los tejidos, quisimos evaluar el efecto de la ausencia del receptor CB<sub>2</sub> sobre la activación astrogliar en el modelo experimental de ELA. De la misma manera que en los anteriores análisis, llevamos a cabo las pruebas en dos puntos temporales, 56 y 84 días (Figura 50). Los animales TDP43<sup>A315T</sup> con el receptor CB<sub>2</sub> intacto no presentaron diferencias significativas en el inmunomarcaje para GFAP a los 65 días de edad, mientras que el grupo de animales correspondiente a los dobles mutantes TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup> mostraron una elevación en el inmunomarcaje (alrededor de 3 veces) respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>, así como con respecto al grupo *WT* utilizado como control. El análisis de la astrogliosis en la etapa avanzada de la enfermedad mostró que ambos animales transgénicos presentaban un incremento significativo similar en la inmunorreactividad para este marcador específico de astrocitos respecto a los animales *WT*.



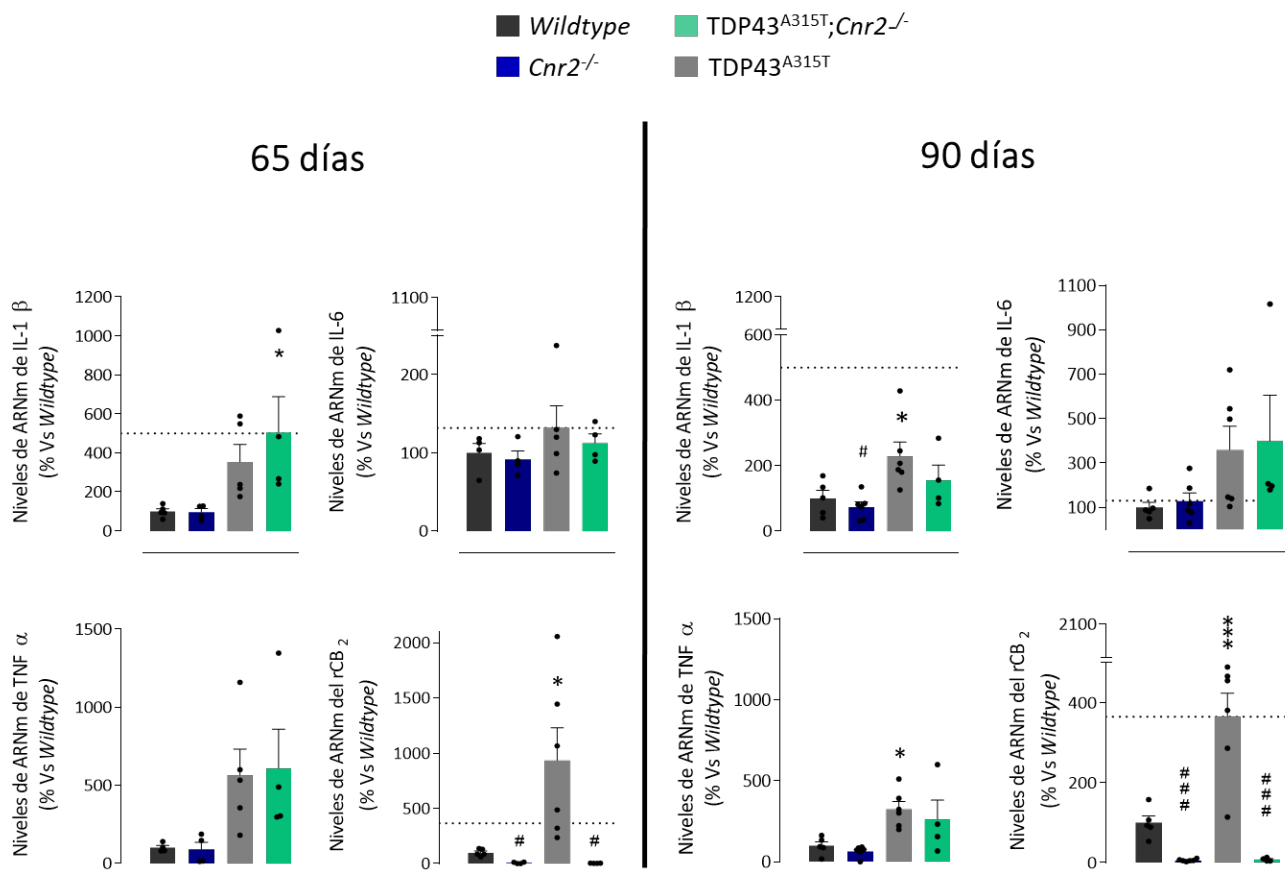
**Figura 50. La delección del receptor CB<sub>2</sub> acelera los procesos de activación astrocitaria en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>** (A)(C) Cuantificación de la densidad de marcaje de inmunofluorescencia para GFAP. Se representa el porcentaje de los valores medios de cada grupo ± SEM con respecto a los animales *WT* (n=5-9). EL análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 (\* respecto a los animales *WT* + Vehículo # respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>). (B)(D) Imágenes representativas del marcaje inmunofluorescente de GFAP de cada grupo experimental a las dos edades analizadas.

Por lo tanto, el análisis de la reactividad glial en los dobles mutantes confirma de nuevo la idea de que el fenotipo patológico provocado por la mutación A315T de TDP43 se acelera en ausencia del receptor CB<sub>2</sub>, aunque no conlleva un agravamiento de los eventos inflamatorios en estadios avanzados de la enfermedad.

### Análisis de marcadores inflamatorios

El último estudio en los ratones dobles mutantes fue el análisis de los niveles de ARNm de ciertas citoquinas proinflamatorias relacionadas con la activación glial. Como en experimentos anteriores, también quisimos evaluar los niveles de ARNm del receptor CB<sub>2</sub>, primero, como control del animal doble mutante generado, y segundo, en el caso de los animales TDP43<sup>A315T</sup>, debido a la implicación de este receptor en los procesos neuroinflamatorios. Para ello, trabajamos con tejido procedente de la sección lumbar de la médula espinal (**Figura 51**).

El análisis de los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias en la fase inicial de la enfermedad mostró una tendencia hacia el incremento en las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en los animales TDP43<sup>A315T</sup>, a pesar de que estos animales no presentaron alteraciones motoras e histopatológicas evidentes. De la misma manera, observamos un incremento algo mayor en el ratón doble mutante TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup>, llegando a alcanzar significación estadística con respecto al control en los niveles para IL-1 $\beta$ , aunque no en TNF $\alpha$ . No observamos diferencias en el caso de la interleuquina IL-6. Por otro lado, en las muestras obtenidas en la fase avanzada de la enfermedad, sí se encontraron diferencias significativas entre las muestras de los animales TDP43<sup>A315T</sup> y los animales *WT* para las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , y una tendencia al incremento en la IL-6. Estos cambios que fueron, en general, similares en magnitud a los observados en los animales TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup>, aunque en este último caso con menor nivel de significación estadística ya que solo observamos tendencias. La carencia del receptor CB<sub>2</sub> por sí sola (animales *Cnr2*<sup>-/-</sup>) no produjo alteración significativa de los niveles de ninguna de las citoquinas estudiadas en ninguno de los periodos temporales analizados. En cuanto a la expresión del receptor CB<sub>2</sub>, nuestros resultados corroboran la validez de nuestro animal modificado genéticamente, ya que ambos grupos experimentales KO-CB<sub>2</sub> no mostraron expresión de ARNm correspondiente a este receptor en el tejido analizado. En los análisis de niveles de expresión del receptor CB<sub>2</sub> encontramos un incremento significativo en los niveles del receptor CB<sub>2</sub>, tanto en etapas presintomáticas como en etapas avanzadas de la enfermedad en los animales TDP43<sup>A315T</sup>, en concordancia con lo descrito en un estudio previo de nuestro grupo<sup>184</sup>.



**Figura 51. La delección del receptor CB<sub>2</sub> no modifica el patrón de expresión de citoquinas proinflamatorias en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>** Niveles de expresión de ARNm en la zona ventral de la médula espinal. Los valores representados son el porcentaje de las medias de cada grupo experimental  $\pm$  SEM (n=5-6) animales por grupo) con respecto a los animales WT. EL análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \*p< 0.05; \*\*\*p<0.001. (\* respecto a los animales WT+Vehículo).





# Diseño experimental 2: Búsqueda de nuevas dianas farmacológicas basada en la administración de derivados fitocannabinoides en un modelo de ELA

Como ya mencionamos anteriormente, uno de los principales esfuerzos de esta Tesis Doctoral ha sido tratar de encontrar nuevas dianas farmacológicas relacionadas con la acción de los cannabinoides que resulten verdaderamente efectivas para la ELA, que sean, por tanto, capaces de retrasar el inicio de la neurodegeneración o bien frenar el avance de esta patología.

En el siguiente diseño experimental nos propusimos evaluar el potencial terapéutico de varios derivados fitocannabinoides con un perfil farmacológico de tipo multidiana acreditado, ya que, como hemos comentado en anteriores ocasiones, creemos que, en una enfermedad multifactorial como la ELA, las mejores aproximaciones farmacológicas serán las que se basen en estrategias de acción múltiple. Además, considerando que el SEC proporciona diferentes dianas farmacológicas, que se modifica durante el progreso de esta enfermedad, y que parece tener influencia modulando la respuesta endógena frente a varios de los eventos fisiopatológicos que se desencadenan en esta patología, el uso de fitocannabinoides podrían representar una aportación muy prometedora a este respecto. Con este objetivo en mente, seleccionamos una batería de compuestos presentes en la planta *Cannabis sativa*, de diferente perfil de modulación del SEC, de modo que se abarquen diferentes posibilidades de combinación de dianas con potencial terapéutico. Por un lado, evaluamos la eficacia de los compuestos  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCV y (*E*)-BCP, compuestos que actúan principalmente a través de la activación de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Por otra parte, evaluamos la posible ventaja que representa la activación preferencial o adicional de otras dianas en el SEC, como los receptores PPAR $\gamma$  o las enzimas que participan en el metabolismo de los endocannabinoides (como FAAH o COX-2). Este fue el caso de los fitocannabinoides CBD, CBDA y CBDV. Además, todos los compuestos propuestos presentan características antioxidantes derivadas de su estructura química, lo que aporta valor añadido que podría resultar particularmente beneficioso para frenar la progresión de esta patología.

## 1. Evaluación del potencial farmacológico de 6 fitocannabinoides como tratamiento para la ELA

### 1.1 Tratamiento farmacológico con fitocannabinoides en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>

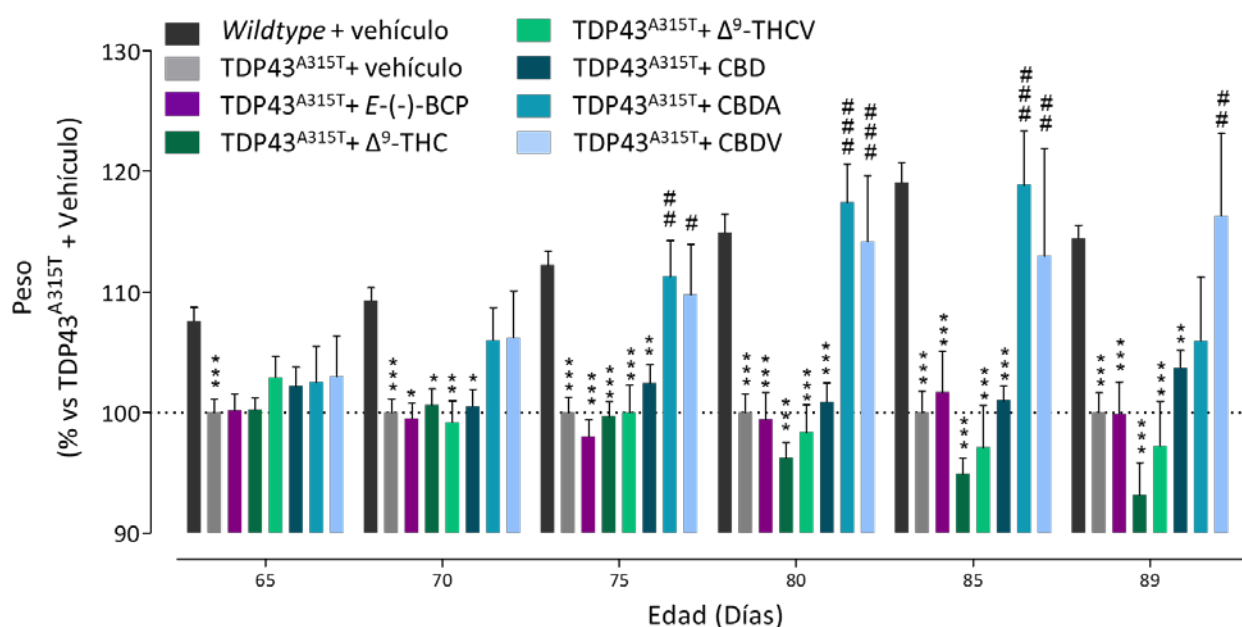
En una primera aproximación experimental, llevamos a cabo un tratamiento farmacológico en los ratones TDP43<sup>A315T</sup> con los diferentes cannabinoides seleccionados. Los compuestos fueron administrados diariamente durante 25 días desde la fase tempranamente sintomática de la enfermedad (65 días). La dosis utilizada en todos los casos fue de 10mg/kg y para comparar se utilizaron animales tanto *WT* como TDP43<sup>A315T</sup> administrados con vehículo. Como en experimentos anteriores, cada día de tratamiento se llevó a cabo el control del peso (**Figura 52**) de los animales como medida de control de bienestar

animal, así como de ausencia de efectos adversos derivados del tratamiento. Semanalmente se realizaron el test de Rotarod (Figura 53) y la evaluación del reflejo de clamping (Figura 54).

## Evaluación de la progresión de la enfermedad

### Análisis de peso corporal

De la misma forma que en los experimentos previos, a medida que avanzó la patología, los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo vieron reducido su peso en comparación con los animales control. La administración con (E)-BCP no alteró la reducción de peso en los animales TDP43<sup>A315T</sup>, mostrando valores similares a los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo. Sin embargo, los tratamientos con  $\Delta^9$ -THC y  $\Delta^9$ -THCV tuvieron un efecto reduciendo el peso corporal de los animales TDP43<sup>A315T</sup> a medida que avanzaba el tratamiento farmacológico, hasta llegar a ser una disminución más marcada en etapas finales del tratamiento, aunque no llegaron a ser significativos. En contraste, los fitocannabinoides de perfil atípico redujeron la pérdida de peso en los animales transgénicos para TDP43<sup>A315T</sup>. Esto ocurrió de forma muy limitada en el caso del fitocannabinoides CBD, pero fue más evidente tras los tratamientos con los compuestos CBDA y CBDV, que mantuvieron el peso de los animales TDP43<sup>A315T</sup> en valores relativamente similares a los de los animales WT. En este último caso, se observaron diferencias significativas con el grupo TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo a partir del décimo día de tratamiento (Figura 52).

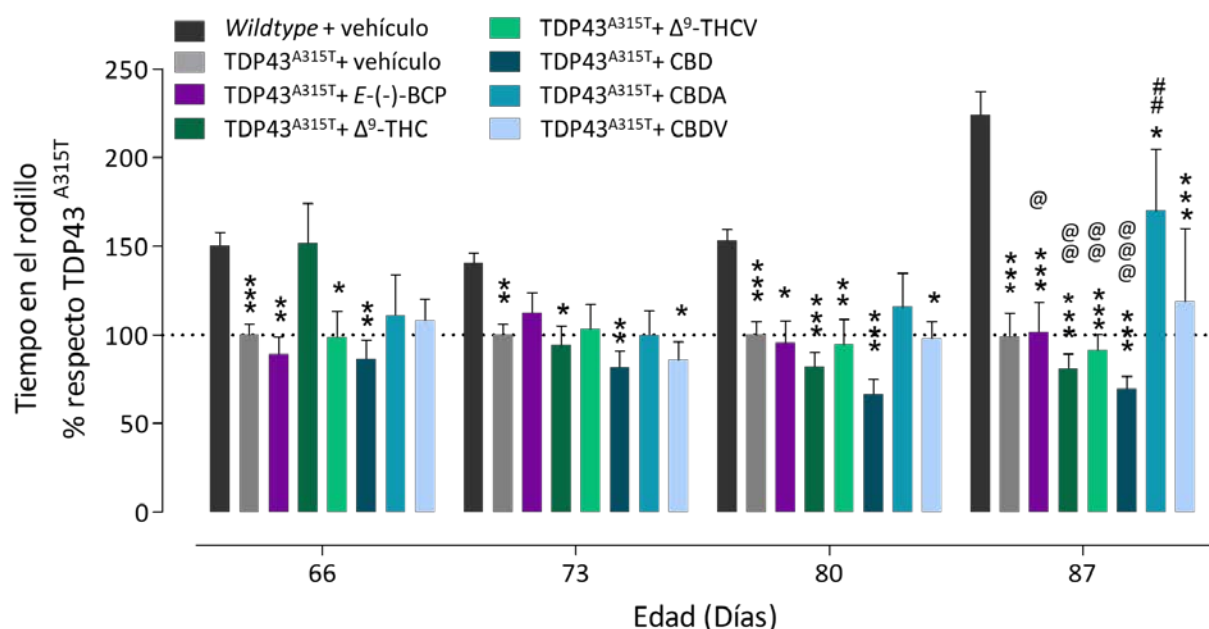


**Figura 52. Efecto de la administración crónica con  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCV, (E)-BCP, CBD, CBDA y CBDV en el peso de los animales TDP43<sup>A315T</sup>.** Control de peso diario durante el periodo de tratamiento. Los datos mostrados están normalizados frente al grupo TDP43<sup>A315T</sup> + vehículo. Se representa la media  $\pm$  SEM de cada grupo experimental (n=7-12). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para valores repetidos, seguido de un test de Bonferroni. \*p<0.5; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 (\* respecto a los animales WT + Vehículo; # respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> + Vehículo)



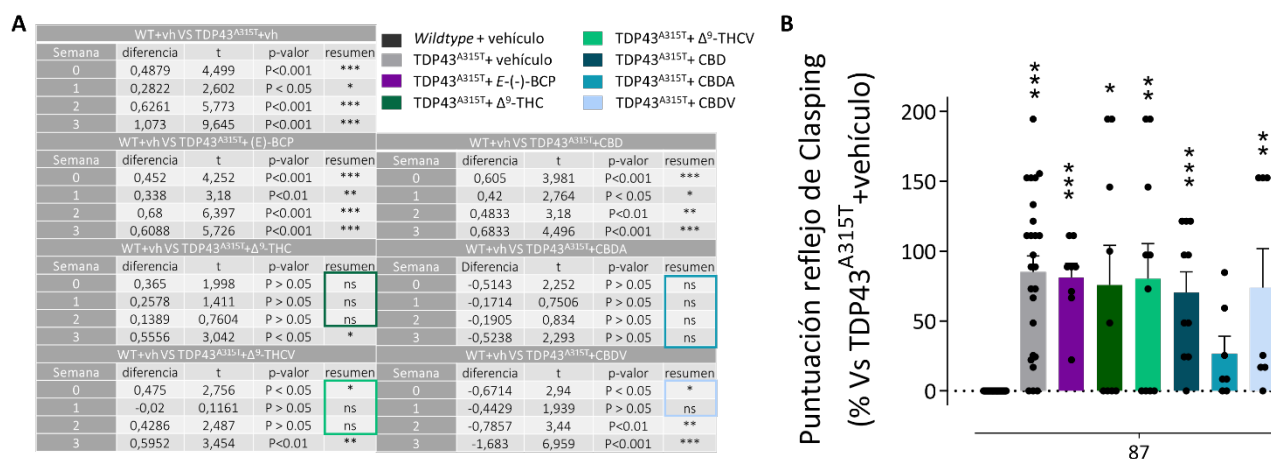
## Estudio de la funcionalidad motora

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la progresión del deterioro motor de los animales TDP43<sup>A315T</sup>, se realizaron semanalmente el test de Rotarod y una evaluación del reflejo de clasping en estos animales. Como podemos observar en la **Figura 53**, los ratones TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo volvieron a mostrar reducciones significativas en el tiempo de permanencia en el rodillo con respecto a los animales *WT* desde el inicio del tratamiento farmacológico. Los fitocannabinoides (*E*)-BCP,  $\Delta^9$ -THCV y CBDA tuvieron aparentemente un efecto positivo reduciendo este deterioro motor en los animales TDP43<sup>A315T</sup> en las primeras semanas tras el inicio del tratamiento. Sin embargo tras tres semanas de tratamiento, solo la administración con el fitocannabinoide CBDA mostró diferencias significativas frente a los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo en la prueba de Rotarod, incrementando significativamente su tiempo de permanencia en el rodillo frente a los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo. Por lo tanto, se puede decir que este fitocannabinoide fue el único que ejerció un efecto beneficioso preservando la funcionalidad motora en este modelo experimental de ELA.



**Figura 53. La administración crónica de  $\Delta^9$ -THCV y (*E*)-BCP, CBDA retrasa la aparición de síntomas motores en los animales TDP43.** Evaluación de la fuerza y coordinación motora mediante el test de Rotarod. Los valores graficados se representan normalizados frente a la media de cada día de los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo (n=7-12). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías, seguido de un test de Bonferroni. \*p<0.5; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (\* Vs los animales WT + Vehículo; # Vs los animales TDP43<sup>A315T</sup> +Vh; @ respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> + CBDA 10mg/kg)

Por otro lado, en los resultados de puntuación del reflejo de clasping, observamos que tras tres semanas de tratamiento (**Figura 54-B**), solo los animales tratados con 10mg/kg de CBDA mostraron una reducción en el grado de aparición del reflejo de clasping en las extremidades posteriores, no siendo significativamente diferente de los animales *WT*. Por lo tanto, el tratamiento con CBDA parece ejercer un efecto positivo en la reducción del grado de distonía y espasticidad observadas en nuestro modelo experimental de ELA.



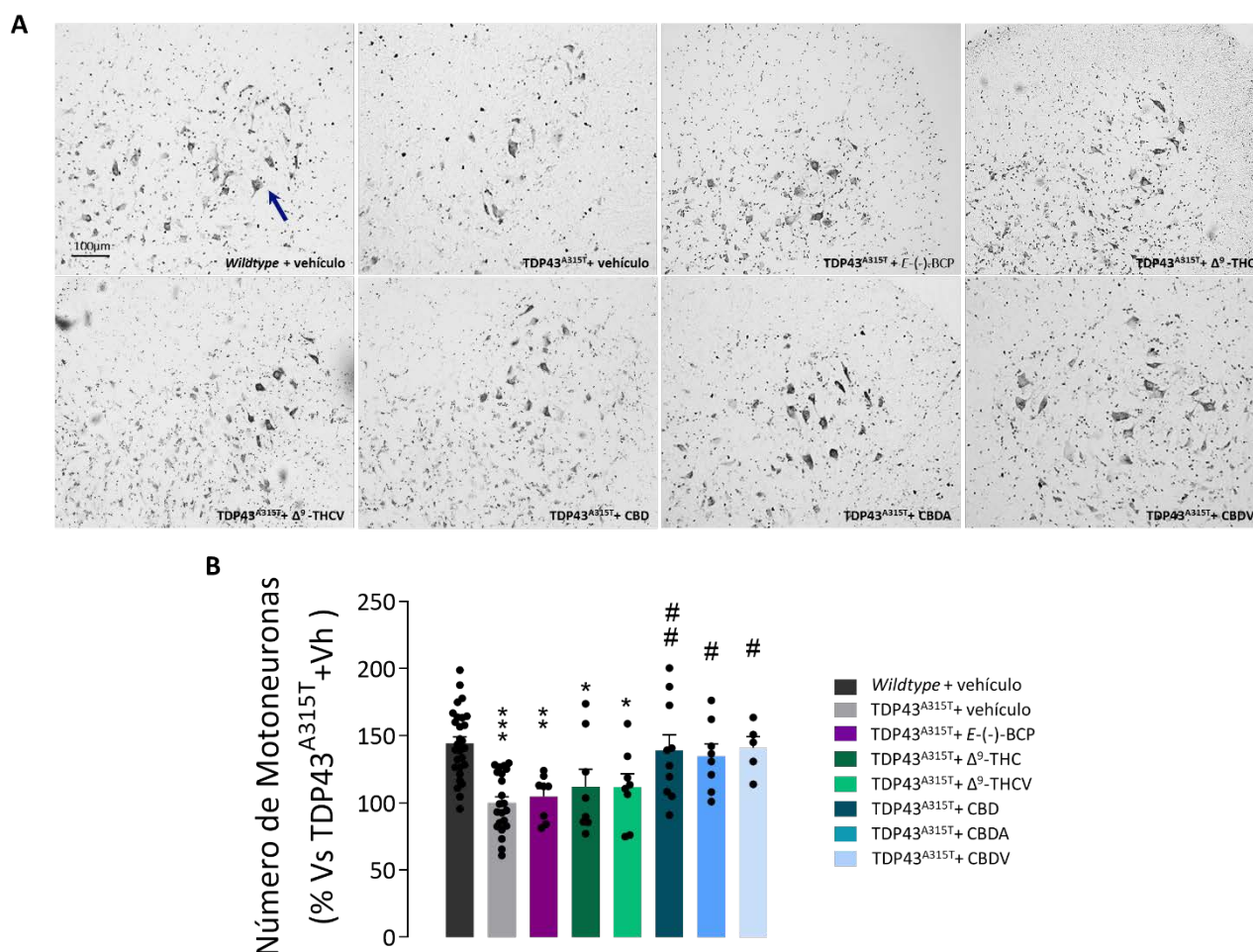
**Figura 54. La administración crónica de CBDA revierte la aparición del reflejo de clamping en los animales TDP43.** (A) Evaluación del reflejo de clamping durante el periodo de tratamiento. Se llevó a cabo el análisis de datos mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post test Bonferroni. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 (\* respecto a los animales WT +vehículo. (n=7-12). (B) Evaluación de la distonía muscular de los ratones mediante la puntuación del reflejo de Clamping a día 87 de tratamiento. Los valores graficados se representan normalizados frente a la media de los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM. Se llevó a cabo el análisis de datos mediante un test de kruskal-Wallis seguido de un post test Mann-Whitney. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 (\* respecto a los animales WT +vehículo).

## Determinación del daño celular

### Estudio de la supervivencia neuronal

Tras el estudio comportamental y para determinar el efecto del tratamiento farmacológico, una vez los animales fueron sacrificados en un estadio avanzado de la enfermedad, se analizó el número de MN en la zona lumbar de la médula espinal de todos los grupos de animales. (Figura 55).

Como en otros experimentos, los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo mostraron una pérdida de entorno al 50% de las MN espinales con respecto a los animales WT utilizados como control. El tratamiento con el fitocannabinoide (E)-BCP no mostró apenas ningún efecto positivo en cuanto a preservar las poblaciones de MN de la médula espinal tras 25 días de tratamiento. Sin embargo, los tratamientos farmacológicos con Δ<sup>9</sup>-THC y Δ<sup>9</sup>-THCV tuvieron un sutil efecto reduciendo la muerte de las MN de la médula espinal, ya que se observó una reducción en el nivel de significancia de la pérdida de MN respecto a los animales WT. Por último, los tratamientos con CBD, CBDA y CBDV sí que tuvieron un claro efecto neuroprotector al preservar el número de MN hasta alcanzar valores cercanos a los obtenidos con los controles. Este diferencia mostró en todos los casos significación estadística con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo.



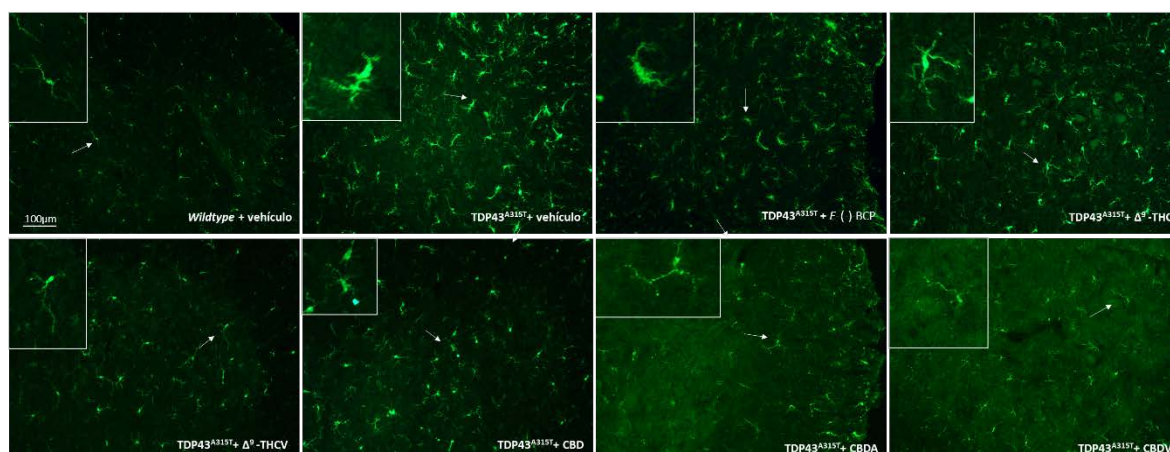
**Figura 55. El tratamiento crónico con CBD, CBDV y CBDA previene la muerte de las MNs en los animales TDP43 (A)** Marcaje de MNs por la técnica de Nissl. Imágenes representativas de cada grupo experimental de la tinción de Violeta de Cresilo en la médula espinal de los animales. **(B)** Cuantificación del número de MNs presentes en el asta ventral de la médula espinal (L4-L6) tras 25 días de tratamiento. Los datos representados corresponden a la media de los porcentajes de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo (n=5-12). Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*p<0.5; \*\*p<0.0.1; \*\*\*p<0.001. (\* respecto a los animales WT+vehículo # respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> +vehículo).

### Estudio de la activación glial

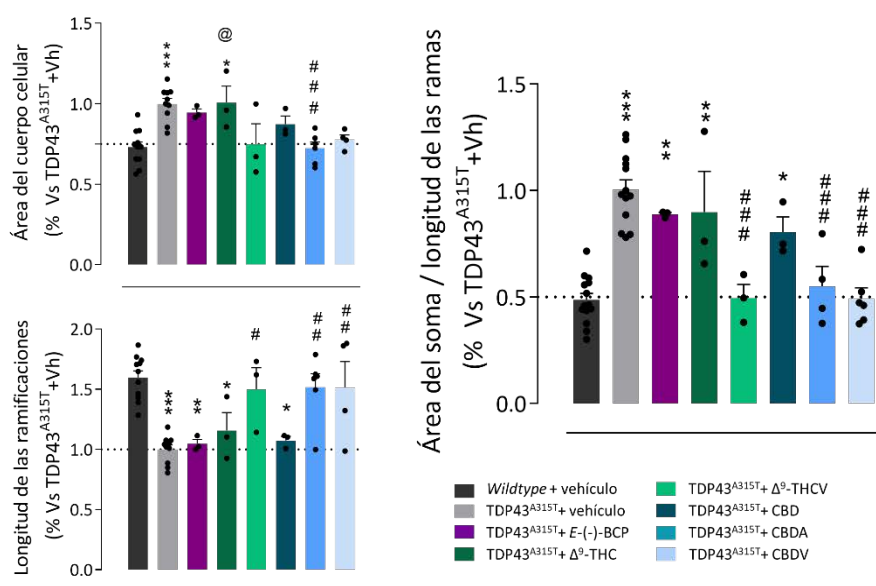
Como en los experimentos del Diseño Experimental #1, a continuación, procedimos a analizar el efecto sobre la reactividad glial de los tratamientos farmacológicos con los fitocannabinoides seleccionados. Para ello, primero llevamos a cabo un análisis morfológico de las células de microglía utilizando la inmunotinción para IBA-1 (**Figura 56**). En particular, se realizó una cuantificación del área del cuerpo celular y la longitud de las ramificaciones en las células microgliales que se encontraban en la zona contigua a las MNs en el asta ventral de la médula espinal. Nuestro análisis mostró que, en las muestras de la médula de los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo, las células de microglía exhibían una morfología de tipo ameboide, es decir, con el cuerpo celular engrosado y un acortamiento de las ramificaciones, morfología que se asocia con un estado de activación de estas células (**Figura 56-A**). Los tratamientos crónicos con los fitocannabinoides Δ<sup>9</sup>-THCV, CBDV y CBDA atenuaron el incremento del tamaño del soma celular observado en las células de microglía de los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo, a pesar de que solo observamos diferencias significativas en el caso del CBDA. El análisis de la longitud de las ramificaciones de las células microgliales mostró que los fitocannabinoides Δ<sup>9</sup>-THCV, CBDA y CBDV causaron un incremento significativo del tamaño de las prolongaciones. En definitiva, los tratamientos con los

fitocannabinoides  $\Delta^9$ -THCV, CBDA y CBDV ejercieron un efecto beneficioso al polarizar el cambio morfológico de las células de microglía hacia fenotipos ramificados, clásicamente relacionados con estados en reposo o fenotipos de activación reparadores, como podemos observar en la **Figura 56-B** atendiendo a la ratio entre el tamaño del cuerpo celular y a las ramificaciones. Los tratamientos con los compuestos  $\Delta^9$ -THC, CBD y (*E*)-BCP no mostraron ningún efecto sobre la morfología de las células de microglía.

**A**



**B**



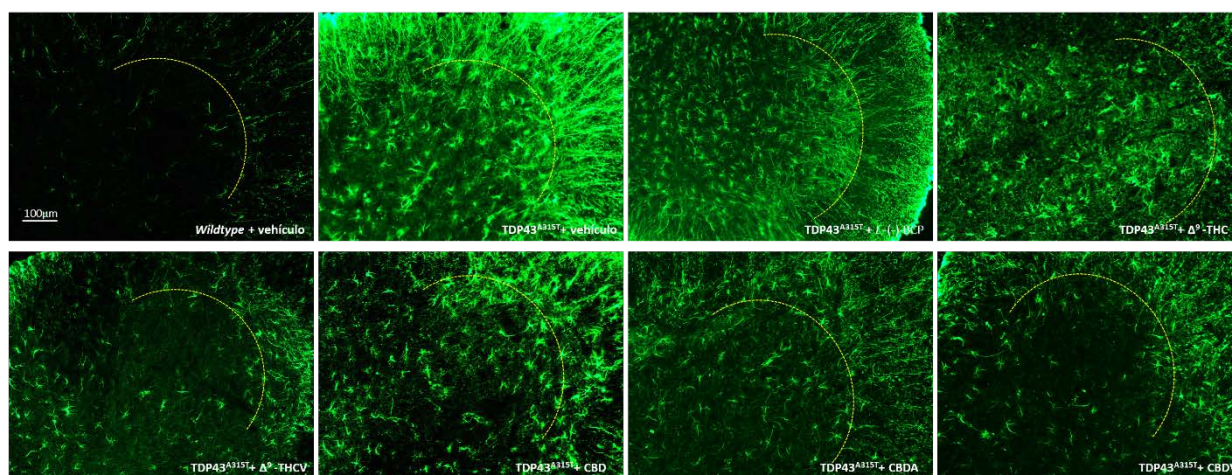
**Figura 56. La administración crónica de  $\Delta^9$ -THCV, CBDA y CBDV modifica la morfología de las células de microglía** Análisis morfológico de las células de microglía de la zona ventral de la médula espinal marcadas con IBA-1. **(B-1)** Medida del área del soma y **(B-2)** la longitud de las ramificaciones de las células de microglía. **(B-3)** Ratio de tamaño del cuerpo celular frente a la longitud de las ramificaciones. Los valores representan la media del porcentaje de la medida de 9 células en 4 animales de cada grupo experimental  $\pm$  SEM con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> +vehículo. Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . (\* respecto a los animales WT+vehículo; # respecto al grupo TDP43<sup>A315T</sup> +vehículo). **(A)** Imágenes representativas de cada grupo experimental.



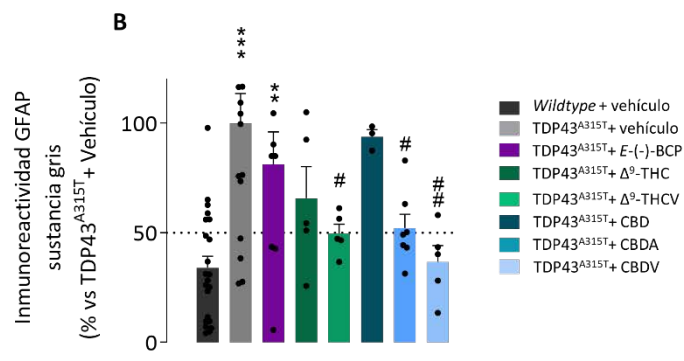
A continuación, usando el marcador específico GFAP, analizamos el efecto de los diferentes tratamientos sobre la población de astrocitos en las muestras de médula espinal de los diferentes grupos de animales estudiados.

Como podemos observar en la **Figura 57**, los animales TDP43<sup>A315T</sup> presentaban un incremento marcado de la inmunoreactividad para GFAP en la zona adyacente a las poblaciones de MN de la médula espinal. Al igual que en el caso de las células de microglía, los tratamientos con los compuestos (*E*)-BCP,  $\Delta^9$ -THC y CBD resultaron poco eficaces en la reducción de esta astrogliosis. Sin embargo, los fitocannabinoides  $\Delta^9$ -THCV, CBDA y CBDV sí que tuvieron un efecto positivo reduciendo la astrogliosis de los animales TDP43<sup>A315T</sup>, siendo el fitocanabinoide CBDV el que mejores resultados obtuvo reduciendo este efecto.

**A**



**B**

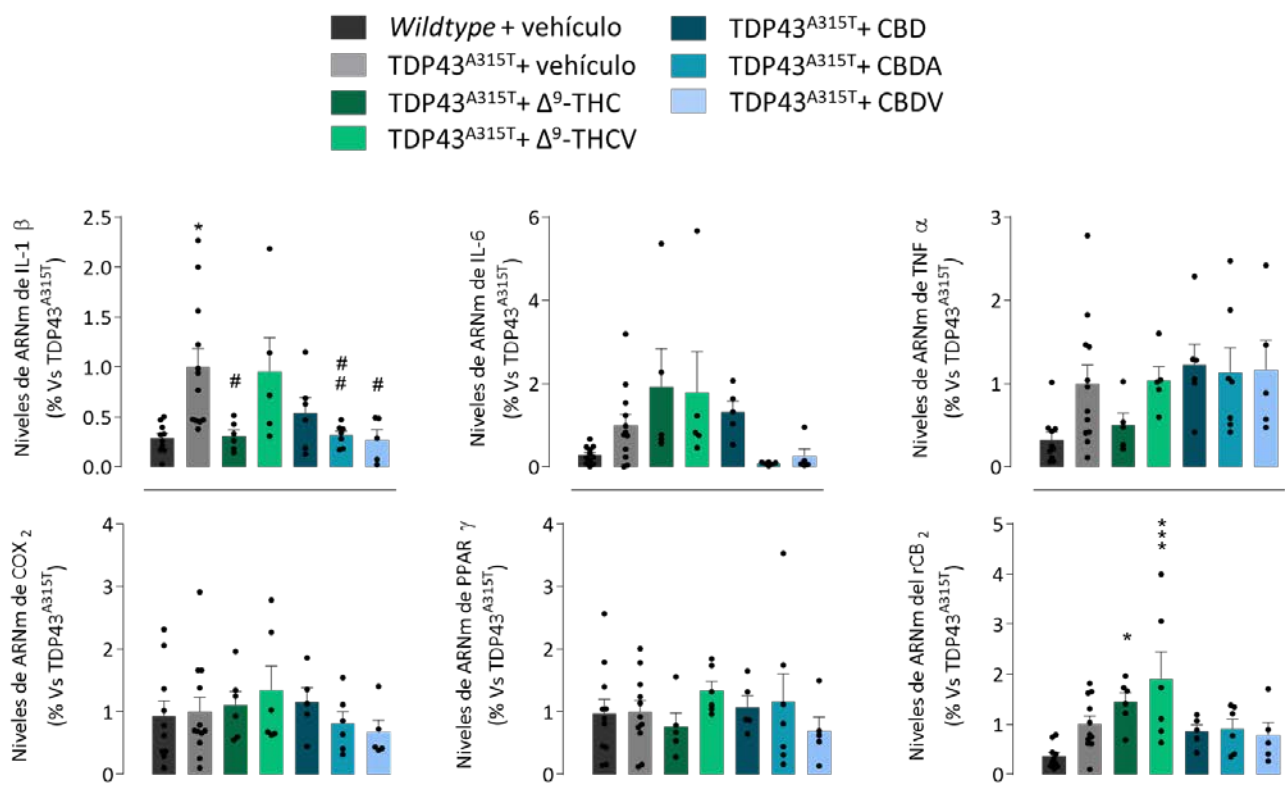


**Figura 57.** Cuantificación de la densidad de marcaje de inmunofluorescencia para GFAP. Se representa el porcentaje de los valores medios de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo (n=4-12). El análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \* $p < 0.05$ . (# respecto a los animales WT + Vehículo). **(B)** Imágenes representativas de cada grupo experimental en las dos edades analizadas.

## Análisis de marcadores inflamatorios

Por último, con el fin de profundizar en el estudio de los efectos de los tratamientos con los distintos fitocannabinoides sobre los eventos inflamatorios asociados con la reactividad glial (tanto de microglía como de astrocitos) observada en los animales transgénicos TDP43<sup>A315T</sup>, se cuantificaron los niveles de ARNm de varias citoquinas proinflamatorias. Además, por

las mismas razones que en ciertos experimentos anteriores, también cuantificamos los niveles de expresión de la enzima COX-2 y los receptores CB<sub>2</sub> y PPAR $\gamma$  (Figura 58). Los resultados del análisis de los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias mostraron una tendencia al alza en varias de ellas en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>, resultando ser estadísticamente significativas solo en el caso de la citoquina IL-1 $\beta$ . Los tratamientos con los fitocannabinoides  $\Delta^9$ -THC, CBDA y CBDV consiguieron reducir significativamente el incremento en la expresión de esta citoquina, no en el caso del  $\Delta^9$ -THCV y del CBD. En el caso de la citoquina IL-6, solo los fitocannabinoides CBDA y CBDV redujeron la expresión de esta citoquina, aunque los efectos no llegaron a ser estadísticamente significativos. Del mismo modo, el fitocannabinoides de perfil clásico  $\Delta^9$ -THC mostró una marcada tendencia en la reducción de la citoquina TNF $\alpha$ , sin alcanzar esta diferencia significación estadística con respecto a los animales transgénicos tratados con vehículo. Por otro lado, observamos cierta tendencia hacia el incremento en la expresión del receptor CB<sub>2</sub> en los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo, en la línea de lo observado en algunos experimentos anteriores, a pesar de que en esta ocasión las diferencias no fueron estadísticamente significativas. De forma curiosa, los tratamientos con  $\Delta^9$ -THC y  $\Delta^9$ -THCV elevaron los niveles del receptor CB<sub>2</sub> en los animales transgénicos hasta alcanzar significación estadística con respecto al grupo control, algo que no ocurrió con el resto de los tratamientos. Por último, no se detectaron cambios relevantes ni en los animales transgénicos, ni tras los diferentes tratamientos, en la expresión de COX-2 y PPAR $\gamma$ .



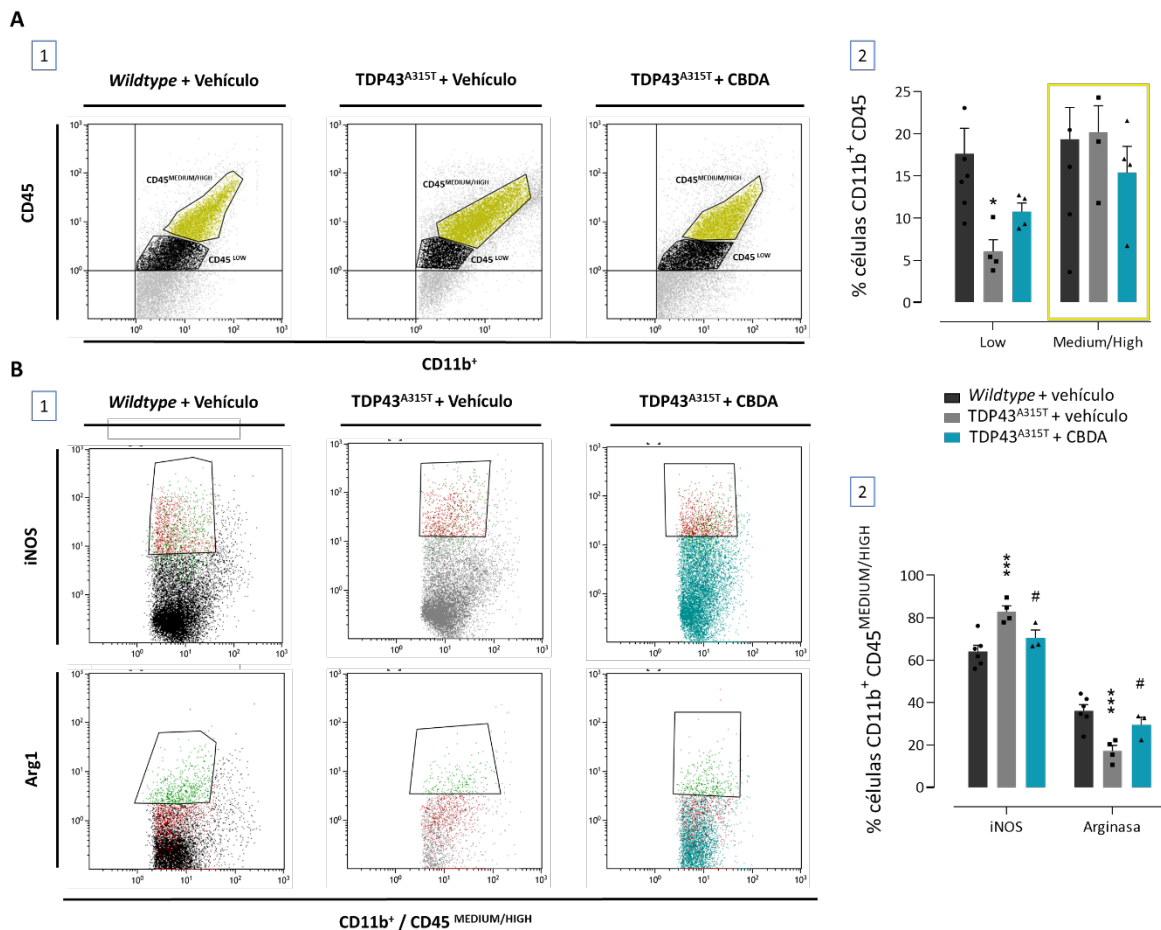
**Figura 58.** Niveles de expresión de ARNm en la zona ventral de la médula espinal. Los valores representados son el porcentaje de las medias de cada grupo experimental  $\pm$  SEM (n=5-6 animales por grupo) con respecto a los animales WT. EL análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \*p<0.05; \*\*\*p<0.001. (\* respecto a los animales WT+Vehículo # respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo).

## 1.2. Evaluación del potencial terapéutico del fitocannabinoide CBDA para el tratamiento de la ELA

A lo largo de este diseño experimental se han evaluado los efectos de 6 fitocannabinoides como potenciales agentes neuroprotectores para el tratamiento de la ELA. Para ello, hemos evaluado tanto sus efectos a nivel neuroconductual como su capacidad de hacer frente a los procesos neurodegenerativos y neuroinflamatorios que ocurren en este modelo experimental. En conjunto, varios compuestos han mostrado cierta eficacia reduciendo algunos de los eventos que participan en el deterioro y muerte de las MNs. Sin embargo, solo uno de ellos ha mostrado el perfil de actuación más completo, el CBDA. Este compuesto ha mostrado ser eficaz en preservar la funcionalidad motora, reduciendo los signos de afectación muscular y preservando la integridad de las MNs. Todo ello apoyado en su fuerte perfil antiinflamatorio, dato que hemos constatado tanto por inmunohistoquímica como con el análisis molecular de marcadores de inflamación. Por este motivo, se ha seleccionado el CBDA para llevar a cabo una serie de análisis adicionales con el fin de profundizar en el estudio de su perfil como potencial agente neuroprotector.

### Evaluación del potencial antiinflamatorio del fitocannabinoides CBDA mediante citometría de flujo

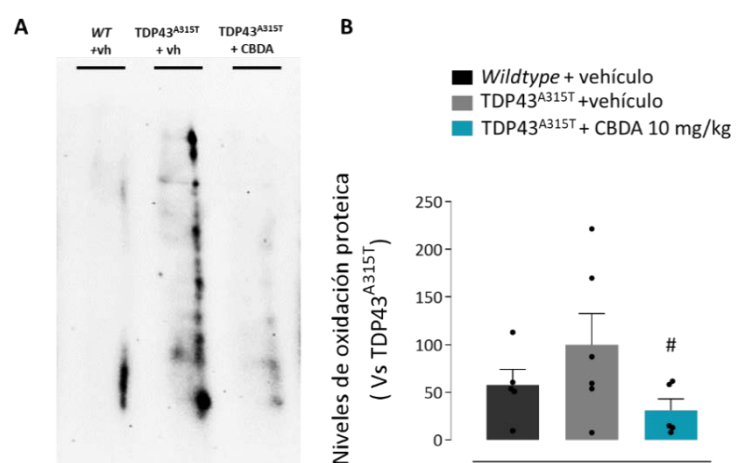
Dados los efectos antiinflamatorios observados tras la administración crónica del fitocannabinoide CBDA en los experimentos *in vivo* en nuestro modelo experimental de ELA, llevamos a cabo una caracterización de las células de microglía mediante técnicas de citometría de flujo en ratones *WT* y transgénicos tratados con vehículo o CBDA. Para ello, desarrollamos un tratamiento crónico de 25 días para posteriormente analizar ciertos marcadores típicos de diferentes estados de microglía activada, como son iNOS y Arg-1 (**Figura 60**). Estos marcadores son específicos de fenotipo de activación y se relacionan con los estadios M1 y M2, respectivamente. Como controles de referencia para identificar las células de microglía se utilizaron los marcadores CD11b y CD45. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el número de células de microglía activada presente en las muestras de médula espinal (identificadas por la expresión de los marcadores CD11b/CD45<sup>MEDIUM/HIGH</sup>) en los diferentes grupos experimentales analizados (**Figura 60 A-1**). Sin embargo, cuando se analizaron los marcadores de activación microglial seleccionados (iNOS y Arg1) en la población de células CD11b/CD45<sup>MEDIUM/HIGH</sup>, pudimos observar cómo los animales TDP43<sup>A315T</sup> presentaban una expresión preferencial del marcador iNOS de activación M1 (fenotipo proinflamatorio), frente al marcador Arg1, marcador de activación fenotípica M2 (fenotipo antiinflamatorio). Esta alteración de la expresión de marcadores de activación fue estadísticamente significativa con respecto a los animales *WT* utilizados como control. El tratamiento con CBDA fue capaz de redirigir la activación microglial hacia un fenotipo antiinflamatorio, identificado mediante la expresión preferencial del marcador Arg1 frente a iNOS con diferencias estadísticamente significativas respecto a los ratones TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo (**Figura 60 A-2**).



**Figura 60. La administración crónica con el fitocannabinoide CBDA produce una polarización de la microglía hacia fenotipos antiinflamatorios (A-1)** Pictograma representativos de los análisis de cada grupo experimental. La microglía se distingue por la expresión de los marcadores CD11b y CD45. **(A-2)** Porcentaje de microglía CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>MEDIUM/HIGH</sup>. **(B-1)** Pictograma representativos de los análisis de cada grupo experimental. **(B-2)** Porcentaje de microglía activada positiva para los marcadores de analizados (\*P<0,05; \*\*\*P<0,001. \* Vs WT+vh # vs TDP43<sup>A315T</sup>+Vh (n=4-6).

## Determinación del potencial antioxidante del fitocannabinoide CBDA

Por otro lado, también analizamos el potencial antioxidante de este compuesto mediante la cuantificación de niveles de proteínas oxidadas en muestras de médula espinal obtenidas de los animales de los tres grupos experimentales (Figura 59). Los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo mostraron un incremento en los niveles de proteínas oxidadas con respecto a los animales WT. El compuesto CBDA mostró un potente efecto antioxidante al reducir significativamente con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo la oxidación de proteínas en la médula espinal de los animales.

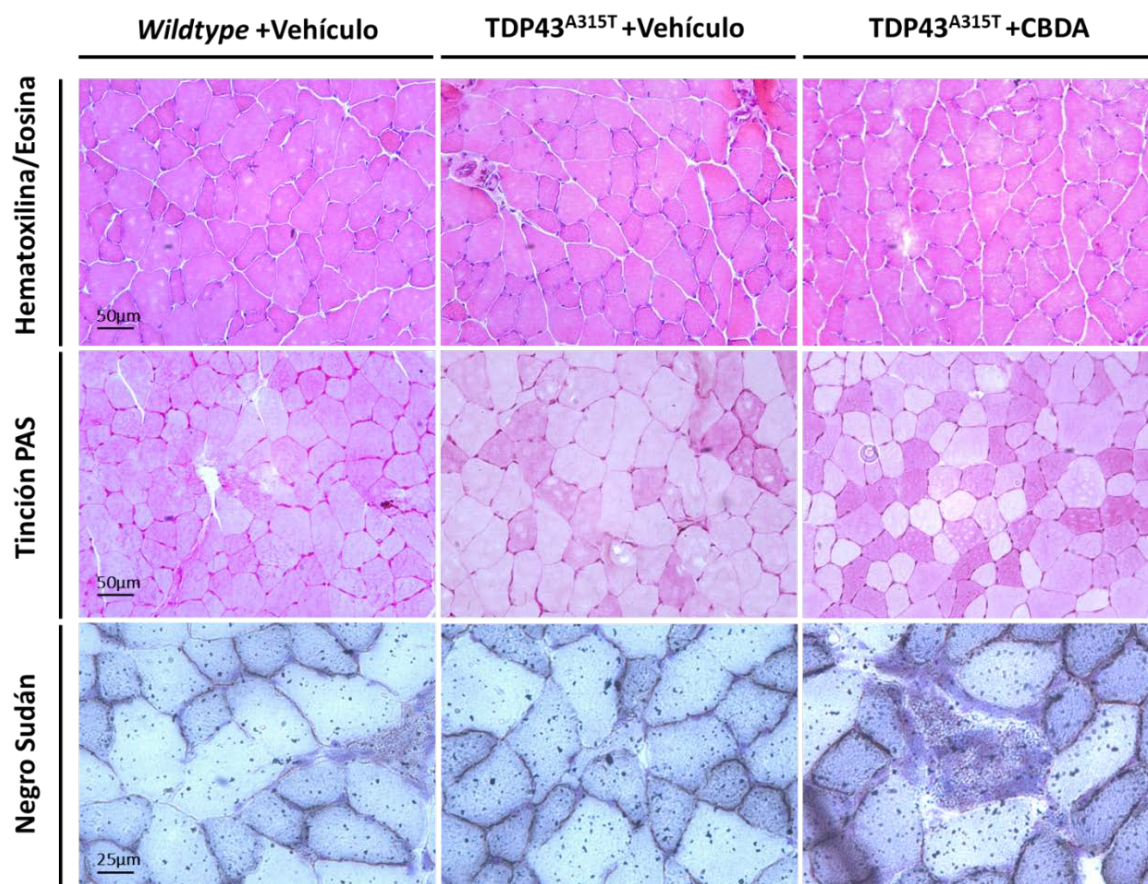


**Figura 59. El fitocannabinoide CBDA a 10mg/kg reduce el nivel de proteínas oxidadas en médula espinal en los animales TDP43<sup>A315T</sup>. (A)** Imagen representativa del oxyblot. **(B)** Análisis de la oxidación proteica de muestras de médula espinal de los animales. Se representa la media ± SEM de cada grupo experimental normalizada frente a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vh. (n=5-6). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vías seguido de un test de Newman Keuls. \*p<0.05 (# respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+ Vh)



## Posible efecto del CBDA sobre el músculo esquelético

Debido a que, en la ELA, además del deterioro en las MNs, se han observado alteraciones, tanto funcionales como estructurales, en el músculo esquelético de los pacientes, sobre el que las MN sinaptan, quisimos evaluar el efecto de nuestro tratamiento farmacológico también en este tejido. Concretamente, se llevó a cabo un estudio histológico del músculo esquelético (músculo *gastrocnemius*) de los ratones con el fin de evaluar posibles alteraciones metabólicas y en la integridad de la fibra muscular. Para ello, se utilizaron diferentes tinciones específicas. Tras un análisis histopatológico, como podemos observar en la **Figura 61**, se observó que los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo no presentaron ninguna alteración estructural o degeneración de la fibra muscular al compararlos con los animales WT. Mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina observamos como las fibras musculares mantienen una estructura compacta, con los núcleos celulares posicionados en la periferia sin formar grupúsculos característicos de la degeneración muscular. Por otro lado, mediante la tinción PAS, observamos que no existen alteraciones en el metabolismo de glucógeno en los animales TDP43<sup>A315T</sup> en comparación con los WT, del mismo modo que ocurre con la carencia de depósitos lipídicos medida por la tinción de negro Sudán. De manera similar, las imágenes procedentes de las mismas tinciones en los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con CBDA mostraron los mismos resultados. Por tanto, los resultados de este estudio nos indican que las deficiencias motoras observadas en este modelo experimental no vienen acompañadas de alteraciones estructurales, atrofia o disfunción del tejido muscular.



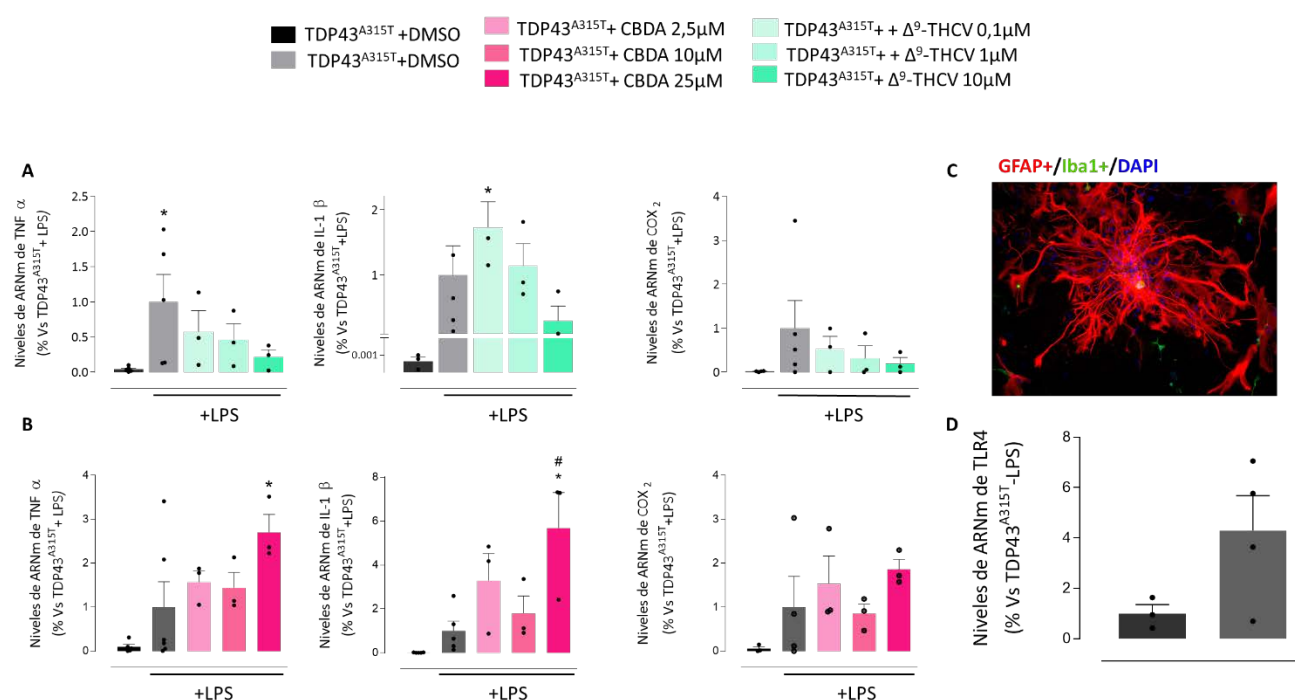
**Figura 61.** Los animales TDP43<sup>A315T</sup> no presentan alteraciones estructurales y metabólicas aparentes. Micrografías representativas del músculo *Gastrocnemius*.

## 2. Estudios con fitocannabinoides en cultivos celulares

En conjunto, los resultados obtenidos tras la administración de los diferentes compuestos fitocannabinoides en los experimentos *in vivo* indican que el  $\Delta^9$ -THCV y sobre todo el CBDA fueron los más prometedores de cada grupo de compuestos analizado (de perfil clásico o atípico) en cuanto a su actividad antiinflamatoria en el modelo experimental murino basado en la mutación de la proteína TDP43<sup>A315T</sup>. Con estos dos compuestos, se realizaron estudios adicionales utilizando en esta ocasión modelos celulares, con el objetivo de identificar el tipo celular sobre el que  $\Delta^9$ -THCV y CBDA ejercen su papel antiinflamatorio.

### 2.1 Tratamiento en cultivos primarios de astrocitos TDP43<sup>A315T</sup>

La primera aproximación experimental consistió en llevar a cabo tratamientos farmacológicos con ambos fitocannabinoides en cultivos primarios de astrocitos obtenidos de crías de ratones TDP43<sup>A315T</sup>. EL objetivo fue estudiar el potencial antiinflamatorio *in vitro* de ambos compuestos realizando para ello curvas de dosis en cultivos de astrocitos añadiendo el cannabinoide una hora antes de la estimulación de los astrocitos con la endotoxina LPS, que se incubó durante 24 horas (Figura 62). En el caso del fitocannabinoides  $\Delta^9$ -THCV se administraron las concentraciones 0.1; 1; 10 $\mu$ M, mientras que las concentraciones seleccionadas para el CBDA fueron 2.5; 10 y 25  $\mu$ M.



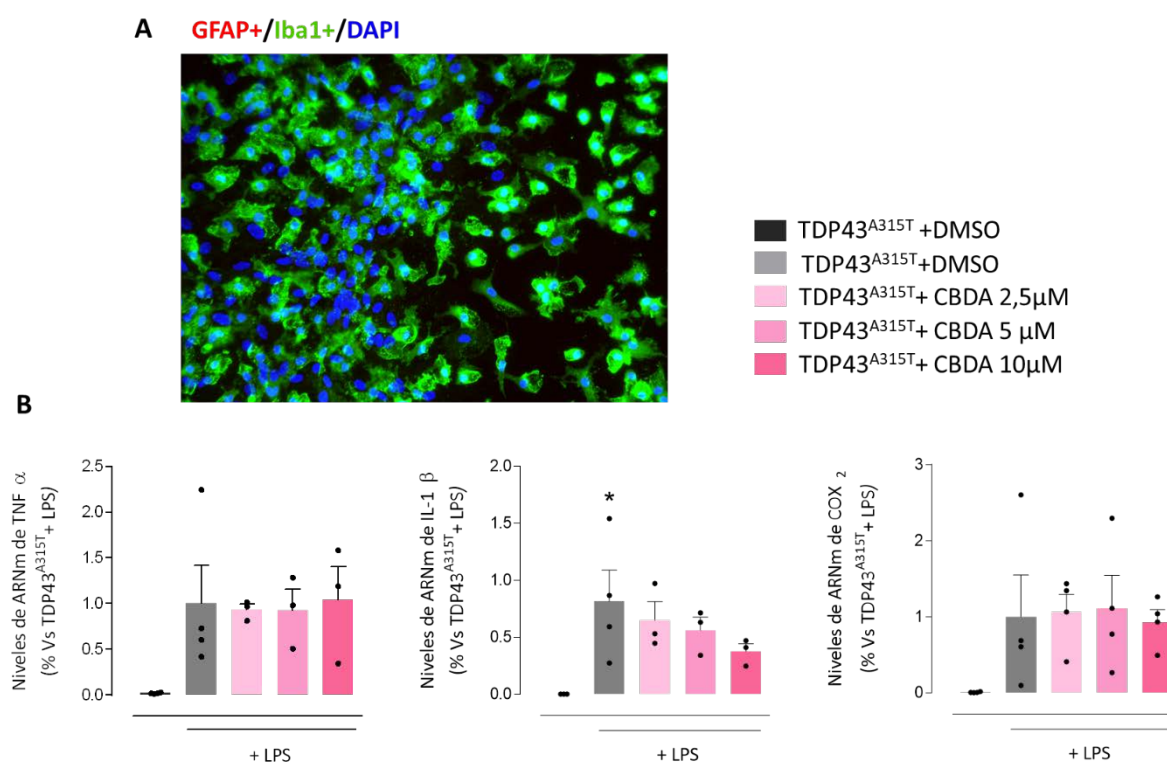
Los efectos del LPS y de los cannabinoides se determinaron mediante el análisis de los niveles de expresión de distintas citoquinas proinflamatorias. En conjunto, los resultados mostraron una tendencia al incremento de la generación de citoquinas tras la administración de LPS, destacando sobre todo la elevación de  $\text{TNF}\alpha$ . También se observó en todos los casos un incremento en los niveles de expresión de la enzima COX-2 en los astrocitos procedentes de animales TDP43<sup>A315T</sup> estimulados con LPS frente a los astrocitos no estimulados. El tratamiento con el compuesto CBDA a las diferentes dosis analizadas no tuvo ningún efecto sobre el aumento de expresión génica de las tres citoquinas proinflamatorias inducidas por LPS en los astrocitos transgénicos. De hecho, CBDA a 25  $\mu\text{M}$  incluso incrementó los niveles de expresión tanto de las citoquinas proinflamatorias como de la enzima COX-2 en los astrocitos (**Figura 62-3A**). Por otro lado, tras la administración del fitocannabinoide  $\Delta^9$ -THCV (**Figura 62-B**), sí que observamos una reducción dosis dependiente de los niveles de expresión tanto de  $\text{TNF}\alpha$  como de IL-1 $\beta$ . En este caso, la administración de  $\Delta^9$ -THCV no tuvo ningún efecto en el perfil de expresión de la enzima COX-2.

Esta diferencia en la acción de ambos fitocannabinoides sugiere que los efectos producidos por el fitocannabinoide  $\Delta^9$ -THCV pueden ser dependientes de la activación de los receptores CB<sub>2</sub>, ya que este compuesto es un agonista de este receptor. A su vez, esto podría explicar la falta de efecto del fitocannabinoide CBDA, que no tiene actividad sobre este receptor. Además, se puede asumir que los efectos observados tras el tratamiento crónico de los animales TDP43<sup>A315T</sup> con el compuesto  $\Delta^9$ -THCV podrían ser explicados, al menos en parte, por su acción directa sobre los astrocitos, tal como se ha visto en el diseño *in vitro*. Sin embargo, esto no parece que ocurra en el caso del fitocannabinoide CBDA, pero debido a que en el modelo murino la población microglial tiene un papel muy relevante, quisimos investigar si en el caso del compuesto CBDA, la posible acción sobre el astrocito podría ser mediada a través de su interacción con la microglía (ver siguiente experimento).

## 2.2 Estudios con CBDA mediante medios condicionados de microglía TDP43<sup>A315T</sup>

Tras lo comentado en el apartado anterior, la segunda aproximación experimental que llevamos a cabo fue un ensayo celular utilizando medios condicionados de microglía añadidos a un cultivo de astrocitos (**Figura 63**). Para ello, administramos el fitocannabinoide CBDA a diferentes dosis (2.5; 5; 10  $\mu\text{M}$ ) en cultivos primarios purificados de microglía procedente de ratones TDP43<sup>A315T</sup>. Tras una hora de incubación, estimulamos las células de microglía con la endotoxina LPS y dejamos incubar el cultivo durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, retiramos el medio de cultivo y se lo añadimos a un cultivo primario purificado de astrocitos procedentes de animales *WT*.

La administración de medios condicionados procedentes de microglía TDP43<sup>A315T</sup> estimulada con la endotoxina LPS a astrocitos *WT* aumentó de forma marcada la capacidad de generar citoquinas proinflamatorias por parte de estos, aunque solo en el caso de la citoquina IL-1 $\beta$  este efecto alcanzó significación estadística. Esto no ocurrió con el factor TNF $\alpha$ , a pesar de lo evidente de las diferencias, seguramente por la gran variabilidad de respuesta mostrada por las diferentes poblaciones de astrocitos. Lo mismo se observó con los niveles de expresión de la enzima COX-2 en los astrocitos *WT* tratados con medios condicionados de microglía TDP43<sup>A315T</sup> estimulada con LPS frente a los astrocitos que fueron incubados con medio procedente de microglía TDP43<sup>A315T</sup> no estimulada. En cuanto al tratamiento con CBDA junto a LPS en las células de microglía TDP43<sup>A315T</sup>, se observó en todos los casos una tendencia hacia la reducción de los niveles de expresión de la citoquina proinflamatorias IL-1 $\beta$  en los astrocitos *WT* a los que se le añadió el respectivo medio condicionado. Sin embargo, ninguna de estas respuestas llegó a tener significancia estadística, quedando por lo tanto como meras tendencias. Por lo tanto, la acción del fitocannabinoide CBDA sobre las células de microglía TDP43<sup>A315T</sup> activadas con LPS podría implicar, si lo trasladamos al contexto *in vivo*, que pueden limitar en cierta medida la respuesta proinflamatoria de los astrocitos.



**Figura 63. Efecto de la administración de CBDA en cultivos de células de microglía TDP43<sup>A315T</sup> estimulada con LPS sobre la capacidad de estas células de estimular la respuesta proinflamatoria en cultivos de astrocitos. (A)** Micrografía representativa del análisis de pureza del cultivo de microglía **(B)** Niveles de expresión de ARNm. Los valores se representan normalizados frente al grupo estimulado (+LPS). Se muestra el valor medio de cada grupo experimental  $\pm$  SEM. (n=3-4). EL análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple de Tukey. \*p< 0.05. (\* respecto a los astrocitos *WT* +DMSO)

### 2.3 Identificación de los posibles mecanismos de acción que median el efecto antiinflamatorio del fitocannabinoide CBDA

Siguiendo con nuestro interés por investigar los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores del tratamiento con el fitocannabinoide CBDA en el modelo murino de TDP43<sup>A315T</sup>, una vez identificadas las células de microglía como una de las posibles poblaciones celulares sobre la que este compuesto ejerce sus efectos, quisimos profundizar algo más en los mecanismos moleculares que subyacen a la acción de este compuesto. En esta ocasión utilizamos la línea celular inmortalizada de células de microglía BV2.

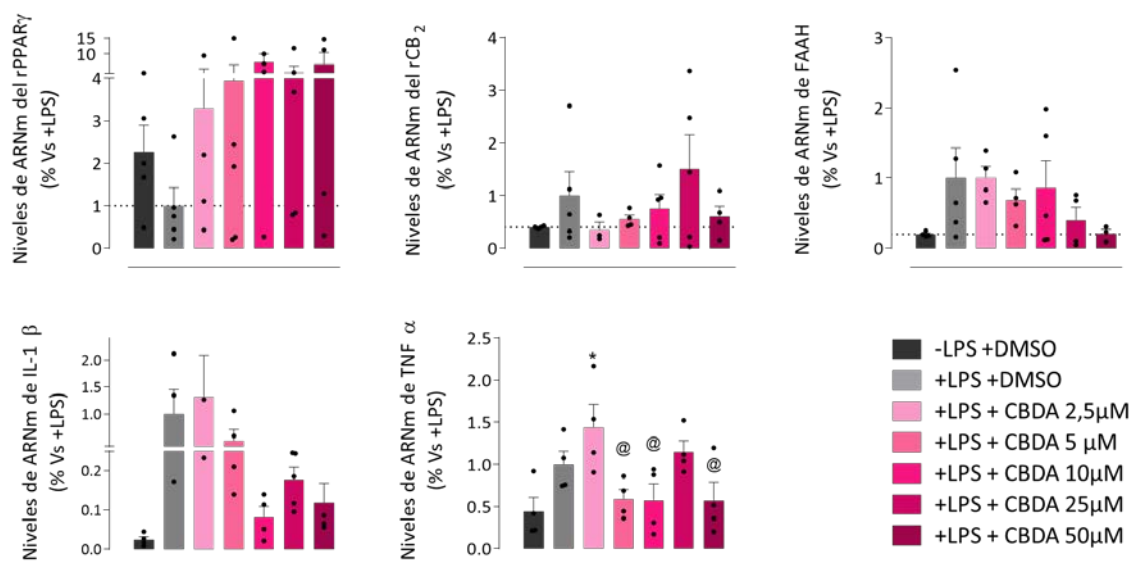
#### Determinación de la concentración óptima para evaluar el mejor potencial antiinflamatorio *in vitro*

En un primer ensayo se quiso establecer la dosis óptima del compuesto CBDA para los estudios de respuesta inflamatoria en la línea celular inmortalizada de microglía de ratón BV2. Para ello, cultivamos células BV2, las tratamos con diferentes dosis de CBDA y posteriormente con la endotoxina LPS. Transcurridas 16 horas de incubación, se recogieron los pellets celulares para su análisis mediante qPCR los niveles de ARNm de ciertas citoquinas y receptores de interés (**Figura 64**).

En la **Figura 64** podemos observar como la estimulación con LPS redujo parcialmente los niveles de expresión de receptores PPAR $\gamma$ , mientras que observamos un ligero incremento en los niveles de expresión del receptor CB $_2$ . Estos receptores están estrechamente relacionados con la activación microglial bajo condiciones inflamatorias, como es el caso de la estimulación con LPS. Asimismo, medimos los niveles de expresión de la enzima de degradación de ECs FAAH, enzima que también está implicada en los procesos inflamatorios. El tratamiento con LPS incrementó en más de 5 veces los niveles de expresión de la enzima FAAH. Por otro lado, la administración de CBDA produjo un incremento de en torno a 5 veces en los niveles de expresión de este receptor, mientras que en el caso del receptor CB $_2$ , observamos una disminución parcial en sus niveles a las concentraciones de 2.5, 5, 10 y 50  $\mu$ M. En el caso de la enzima de degradación de ECs FAAH, solo la aplicación de las concentraciones más altas de CBDA (25 y 50  $\mu$ M) fueron capaz de revertir esta sobreexpresión inducida por LPS. A pesar de las marcadas tendencias observadas, ninguno de estos efectos mostró diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos experimentales estudiados, probablemente debido a la alta variabilidad observada en algunos grupos y a tamaños muestrales en ocasiones limitados.

En relación con los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias, observamos que la estimulación con la endotoxina LPS provocó el incremento de expresión tanto de IL-1 $\beta$  como de TNF $\alpha$  en comparación con las células no estimuladas. La aplicación del fitocannabinoide CBDA mostró efectos beneficiosos reduciendo estos niveles a las concentraciones 10, 25 y 50  $\mu$ M en el caso de la citoquina IL-1 $\beta$  y a las concentraciones de 5, 10 y 50  $\mu$ M en el caso de TNF $\alpha$ . De nuevo, a pesar de los efectos observados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las citoquinas analizadas.





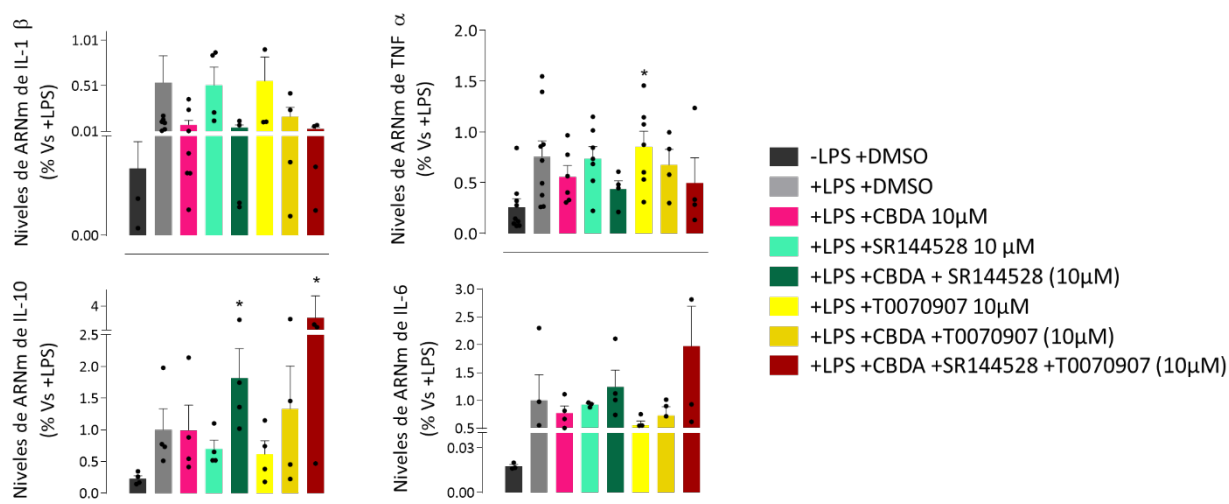
**Figura 64. La administración con CBDA a las células BV2 reduce los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en una manera dosis dependiente.** Niveles de expresión de ARNm. Los valores se representan normalizados frente al grupo estimulado (+LPS). Se muestra el valor medio de cada grupo experimental  $\pm$  SEM. (n=4-5). El análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*p<0.05(\* vs WTvs+vh; @vs TDP43<sup>A315T</sup>+CBDA (2.5 $\mu$ M))

## Identificación de dianas celulares

Tras los resultados obtenidos con la curva de concentraciones de CBDA, seleccionamos la concentración de 10  $\mu$ M como la concentración óptima de CBDA para continuar los estudios. El siguiente experimento consistió en tratar de elucidar los mecanismos de acción responsables de la actividad antiinflamatoria del fitocannabinoide CBDA (Figura 65). Para ello, combinamos la aplicación de CBDA a 10  $\mu$ M con los compuestos SR144528, antagonista CB<sub>2</sub> y T0070907, inhibidor del receptor PPAR $\gamma$ , ambos a una concentración 10  $\mu$ M, solos o en combinación. En este caso se analizaron las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, y TNF $\alpha$ .

Los resultados demostraron de nuevo que la administración de LPS elevó los niveles de expresión de la citoquina IL-1 $\beta$  y de TNF $\alpha$ , efecto que fue atenuado por la coadministración de CBDA. Ninguno de estos dos efectos parece implicar la activación del receptor CB<sub>2</sub> o del receptor PPAR $\gamma$ , ya que el bloqueo farmacológico de ambos receptores, juntos o por separado, no alteró en ningún caso el efecto observado sobre la expresión de IL-1 $\beta$  o de TNF $\alpha$  tras la administración del fitocannabinoide CBDA a 10  $\mu$ M. En el caso de la interleucina IL-6, ninguno de los tratamientos ejerció efectos significativos. Por último, analizamos los niveles de expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10. En este caso, el tratamiento con CBDA 10  $\mu$ M acompañado de los antagonistas de ambos receptores ejerció efectos positivos en el aumento de la expresión de este marcador antiinflamatorio, potenciándose el efecto observado al bloquear únicamente el receptor CB<sub>2</sub>.

Por tanto, estos resultados parecen indicar que los efectos antiinflamatorios de la administración del fitocannabinoide CBDA deben implicar la participación de algún otro mecanismo pendiente de ser identificado.



**Figura 65. El bloqueo simultáneo de los receptores CB<sub>2</sub> y PPAR $\gamma$  en las células de microglía potencia los efectos antiinflamatorios del fitocannabinoide CBDA.** Niveles de expresión de ARNm. Los valores se representan normalizados frente al grupo estimulado (+LPS). Se muestra el valor medio de cada grupo experimental  $\pm$  SEM) (n=4-5). EL análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*p< 0.05. (\* respecto al grupo -LPS+DMSO





# Diseño experimental 3. Validación del potencial terapéutico del fitocannabinoide CBDA. En búsqueda de un tratamiento combinado.

Tal y como se ha comentado anteriormente, debido a que la ELA es una enfermedad multifactorial, la búsqueda de un tratamiento para esta enfermedad debe concebirse desde un enfoque multi diana, ya sea con una terapia combinada, o bien con un compuesto capaz de activar diversas dianas farmacológicas potencialmente beneficiosas para luchar contra la progresión de esta enfermedad. En ese sentido, hemos encontrado en el CBDA un prometedor candidato para continuar con la investigación hacia un tratamiento para la ELA, ya que se le atribuyen múltiples propiedades interesantes, como su potencial antiinflamatorio o sus características antioxidantes, que podrían resultar en la neuroprotección de las MNs. Por este motivo, creemos que nuestros resultados justifican que sea propuesto como posible complemento o alternativa a la terapia farmacológica actual en clínica, que es el Riluzol. Para avanzar en esta idea, nos propusimos estudiar los efectos de una terapia combinada entre ambos en el modelo de ratón transgénico TDP43<sup>A315T</sup>.

Antes de desarrollar esta terapia combinada con el fármaco Riluzol, quisimos seleccionar la dosis que más se ajustaba a nuestro modelo experimental de ambos compuestos. En el caso del Riluzol, debido a la falta de datos preclínicos robustos, no hay una dosis óptima establecida para la aplicación de este compuesto en ensayos experimentales en modelos animales. Además, en el momento de realización de este Diseño experimental no existían datos de un tratamiento farmacológico con Riluzol en el modelo de ratón transgénico TDP43<sup>A315T</sup> con el que trabajamos. Por este motivo, decidimos ensayar dos dosis diferentes en una primera aproximación farmacológica.

## 1. Determinación de la dosis óptima de CBDA y Riluzol en el ratón TDP43<sup>A315T</sup>, modelo experimental de ELA

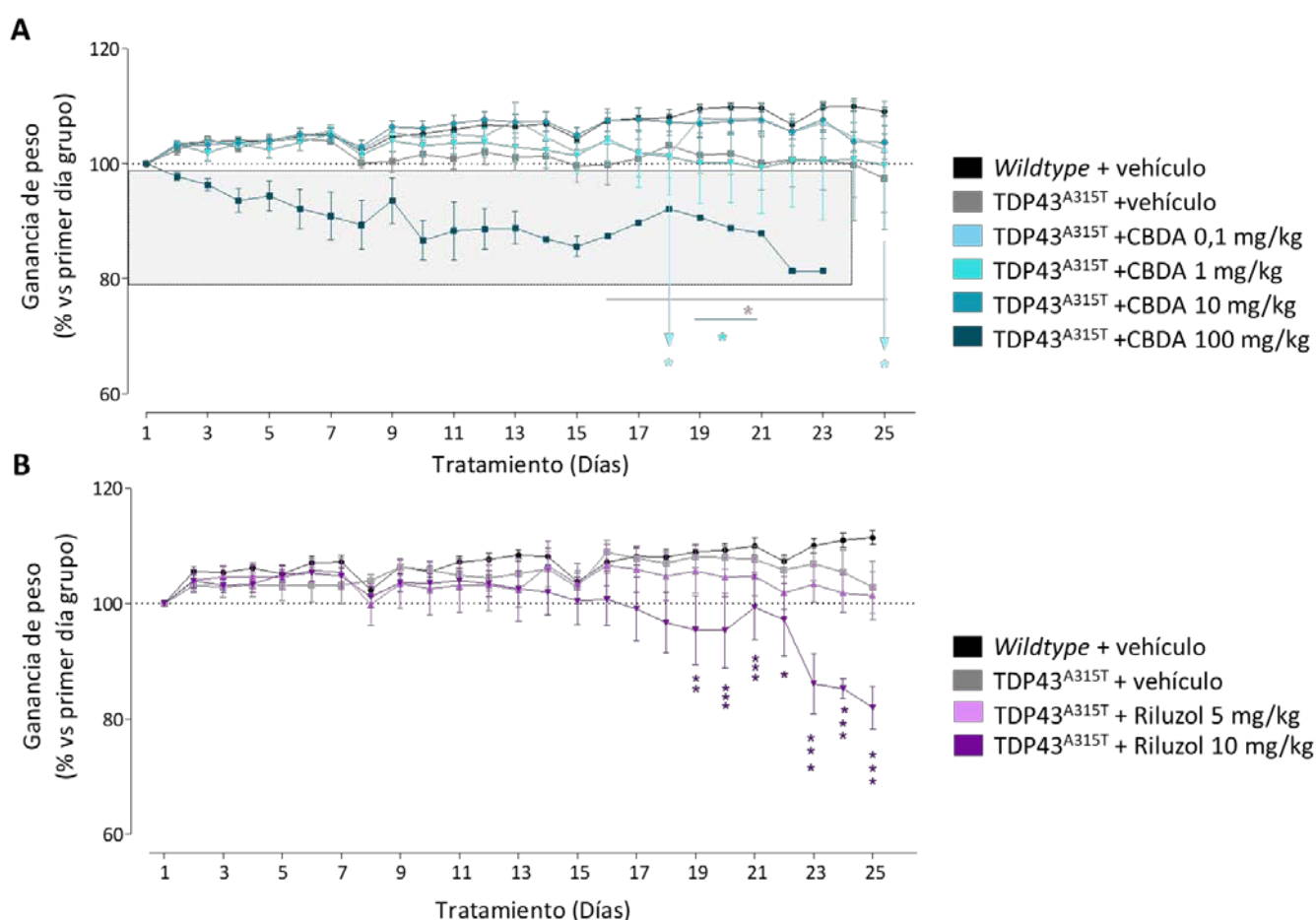
Para determinar la dosis óptima de ambos compuestos para ser testados en combinación, llevamos a cabo un tratamiento farmacológico de 25 días de duración con diferentes dosis de ambos compuestos (CBDA: 0.1;1;10; 100 mg/kg. Riluzol: 5;10 mg/kg), siguiendo el mismo diseño que en experimentos anteriores

### **Evaluación de la progresión de la enfermedad**

Como en anteriores ensayos farmacológicos, durante todo el tratamiento valoramos el estado general de los animales mediante controles observacionales y monitorización diaria de peso. Además, semanalmente evaluamos el deterioro motor mediante pruebas comportamentales de coordinación, fuerza y debilidad muscular.

## Análisis de ganancia de peso

En la **Figura 66** se muestran la ganancia de peso de los animales en ambos tratamientos farmacológicos. En la **Figura 66-A** se observa como en fases avanzadas de la enfermedad los animales transgénicos tratados con vehículo vieron reducida la ganancia de peso de manera significativa con respecto a los animales *WT*. El tratamiento con las diferentes dosis de CBDA retrasó esas diferencias significativas: En el caso de las dosis 0.1 y 1 mg/kg mejoraron la ganancia de peso de los animales hasta casi desaparecer las diferencias con los animales *WT*. Por otro lado, la dosis de 10 mg/kg no mostró ninguna diferencia significativa frente a los animales *WT* durante la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, la administración crónica con CBDA a las tres dosis tuvo un efecto positivo retrasando la reducción de peso característica del modelo experimental. Además, este efecto resultó ser dosis dependiente, mostrando los mejores resultados en el grupo de animales a los que se les administró CBDA a 10mg/kg. Sin embargo, la administración de CBDA a dosis muy elevadas (100 mg/kg) resultó perjudicial para los animales. Desde la primera administración a esta dosis los animales sufrieron una marcada pérdida de peso que se mantuvo hasta el sacrificio compasivo de todos los individuos del grupo experimental. Por este motivo, este grupo experimental tuvo que ser eliminado del experimento. El resumen del análisis estadístico se encuentra en el anexo Material Suplementario en el **cuadro S3**.

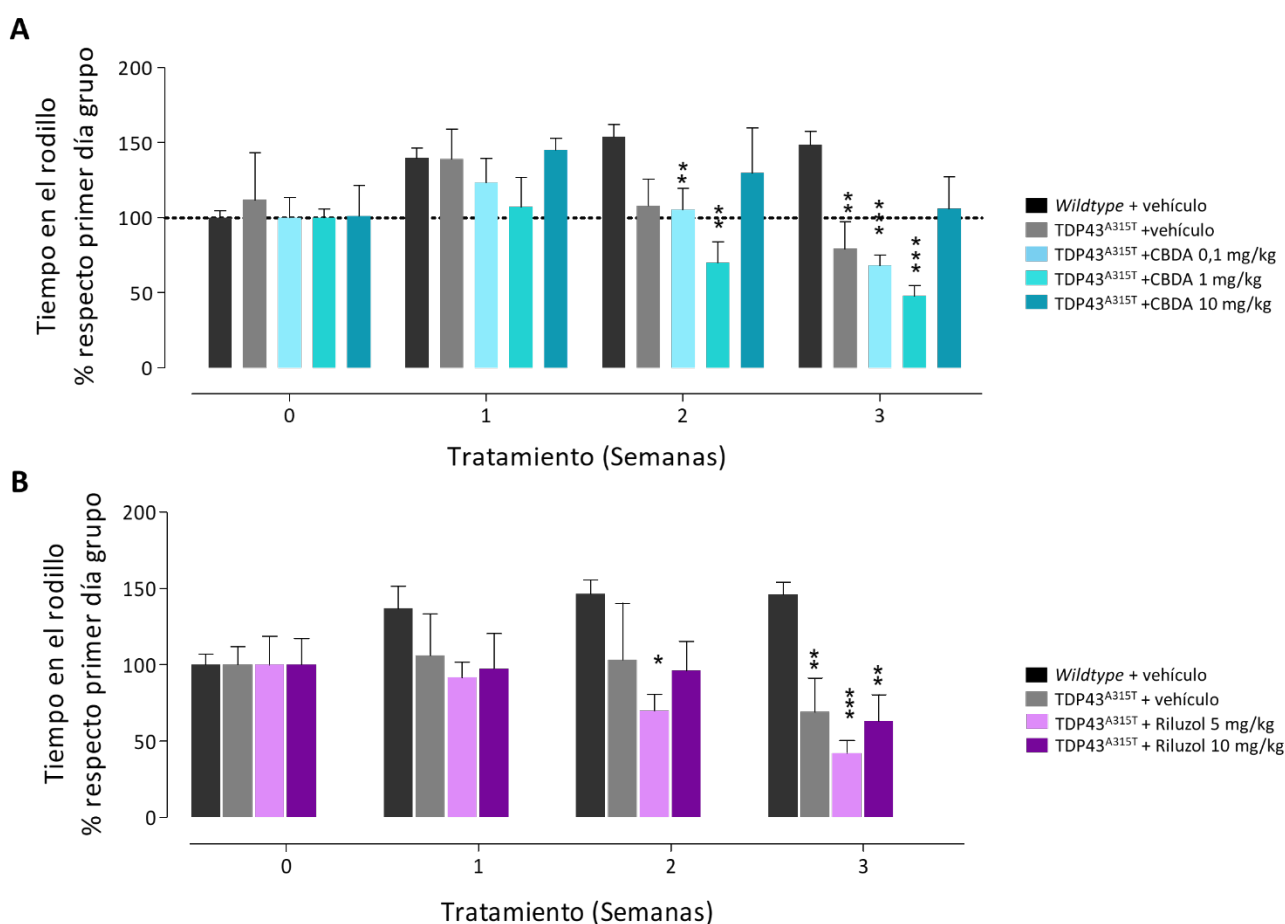


**Figura 66. Control de peso diario durante el tratamiento farmacológico.** Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM de cada grupo experimental. (n=6-13). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para valores repetidos, seguido de un test de Bonferroni. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  (\* Vs WT+vh)

Por otro lado, en el caso del tratamiento crónico con diferentes dosis de Riluzol (**Figura 66-B**) observamos que animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo no vieron alterada su ganancia de peso corporal durante el periodo de tratamiento. Sin embargo, la dosis de Riluzol 10 mg/kg provocó en los animales una reducción significativa de la ganancia de peso respecto a los animales WT en los últimos días de tratamiento

#### Estudio de la funcionalidad motora

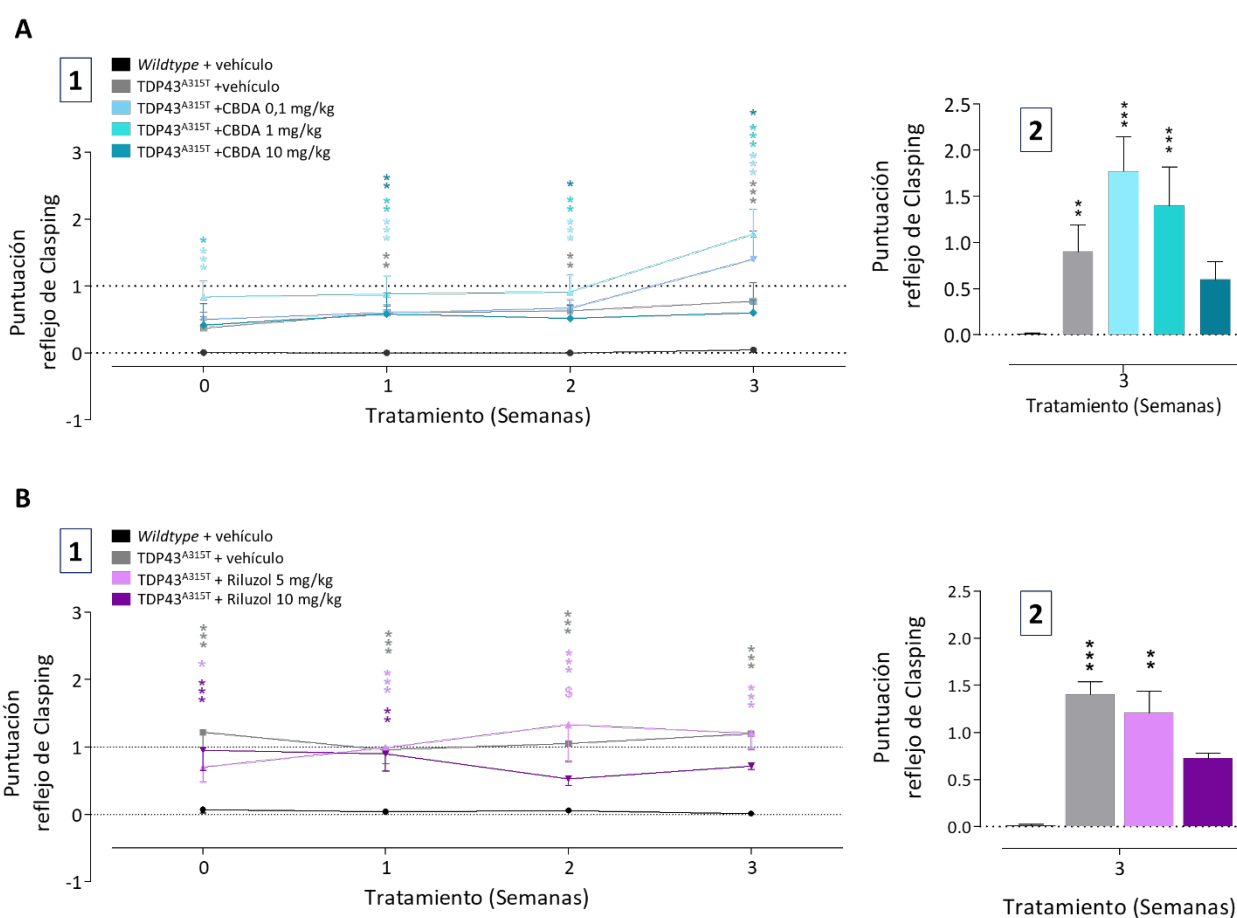
Con respecto al estudio de la funcionalidad motora de los animales, se analizaron tanto la prueba de Rotarod (**Figura 67**) como la aparición y avance del reflejo de clasping (**Figura 68**). De la misma forma que en experimentos anteriores, ambos test conductuales mostraron un deterioro progresivo en el estado y la función muscular en los animales portadores de la mutación humana para TDP43. El tratamiento con CBDA a las dosis de 0.1 y 1 mg/kg de CBDA no alteró este patrón de deterioro progresivo, mientras que la dosis de CBDA 10 mg/kg sí que tuvo un efecto positivo que se refleja en la pérdida de la significación estadística respecto al grupo WT, algo que fue evidente tras 2 y 3 semanas de tratamiento, y que se interpreta como un retraso en la aparición de los síntomas motores medidos por el test de Rotarod (**Figura 67-A**). En el caso del tratamiento farmacológico con Riluzol (**Figura 67-B**), observamos que el tratamiento con este antiexcitotóxico no



**Figura 67. La administración farmacológica de CBDA 10mg/kg retrasa la disfunción motora en los animales TDP43<sup>A315T</sup> mientras que ninguna dosis de Riluzol modificó la progresión de la enfermedad.** Evaluación de la fuerza y coordinación motora mediante el test de Rotarod. Los valores graficados se encuentran normalizados frente a la media del primer día de cada grupo. Se representa la media de permanencia en el rodillo cada día de prueba  $\pm$  SEM (n=6-13). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías, seguido de un test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales WT + Vehículo). **(A)** Tratamiento farmacológico con CBDA a diferentes dosis **(B)** Tratamiento farmacológico con dos dosis de Riluzol. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales WT + Vehículo).

ejerció ningún efecto sobre los parámetros de fuerza y coordinación motora analizados con esta prueba comportamental en los animales TDP43<sup>A315T</sup>, algo que ya ha sido descrito anteriormente en otros modelos murinos de ELA.

A continuación, evaluamos la distonía y espasticidad de los animales mediante la puntuación de reflejo de clasp. Tras tres semanas de tratamiento con las diferentes dosis de CBDA, se observó que a 10 mg/kg este fitocannabinolide redujo ligeramente la puntuación de este reflejo en los animales (Figura 68-A2), hasta perder las diferencias con los animales WT tras tres semanas de tratamiento (Figura 68-A2). Así mismo, en la Figura 68-B1 podemos observar que, mientras que la administración de 5 mg/kg de Riluzol no produjo ningún efecto, la dosis de 10 mg/kg de Riluzol también atenuó significativamente la puntuación del reflejo de clasp en los animales transgénicos con respecto a los animales tratados con vehículo.

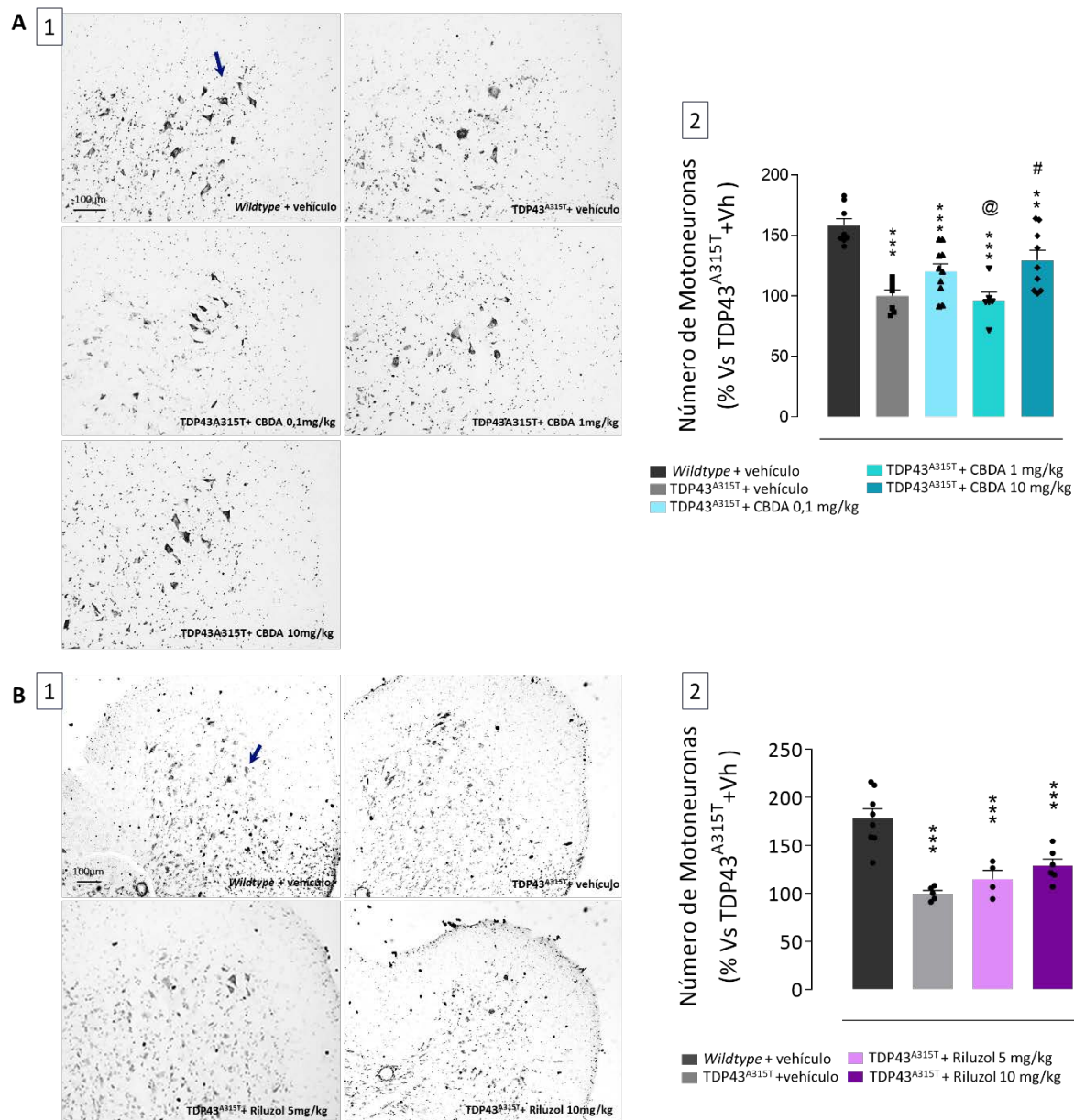


**Figura 68. Evaluación de la funcionalidad motora durante el tratamiento farmacológico. (A-1)(B-1)** Evaluación de la distonía y debilidad muscular mediante la puntuación del reflejo de clasp durante el tratamiento farmacológico. Los valores graficados se encuentran normalizados frente a la media del primer día de cada. Se representa la media de permanencia en el rodillo cada día de prueba  $\pm$  SEM. (n=6-13). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías, seguido de un test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales WT + Vehículo; \$Vs TDP43<sup>A315T</sup>+Riluzol 10mg/kg). **(A-2)(B-2)** Evaluación de la distonía y debilidad muscular tras tres semanas de tratamiento. Los datos se analizaron mediante un test de Kruskal-Wallis seguido de un test de Dunn. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . (\* Vs WT+vh).

## Determinación del daño celular

### Estudio de la supervivencia neuronal

A continuación, quisimos evaluar la eficacia de la administración de ambos compuestos en la preservación de las MNs en el modelo experimental de ELA basado en la expresión de la proteína TDP43<sup>A315T</sup>. (Figura 69). Para ello, realizamos un conteo de número de MN en el asta ventral de la médula espinal marcadas mediante la tinción de Nissl.



**Figura 69. La administración de 10 mg/kg de CBDA incrementa la supervivencia de las MNs espinales en los animales TDP43<sup>A315T</sup>.** Marcaje de MNs por la técnica de Nissl. **(A)** Cuantificación del número de MNs presentes en el asta ventral de la médula espinal. Los datos representados corresponden a la media de los porcentajes de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> +vehículo (n=6-13). Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*p<0.5; \*\*p<0.0.1; \*\*\*p<0.001. (\* Vs WT+vh; # Vs TDP43<sup>A315T</sup> +vh @ Vs TDP43<sup>A315T</sup> +CBDA 10mg/kg). **(B)** Imágenes representativas de cada grupo experimental de la tinción violeta de Cresilo en el asta ventral de la médula espinal de los animales.

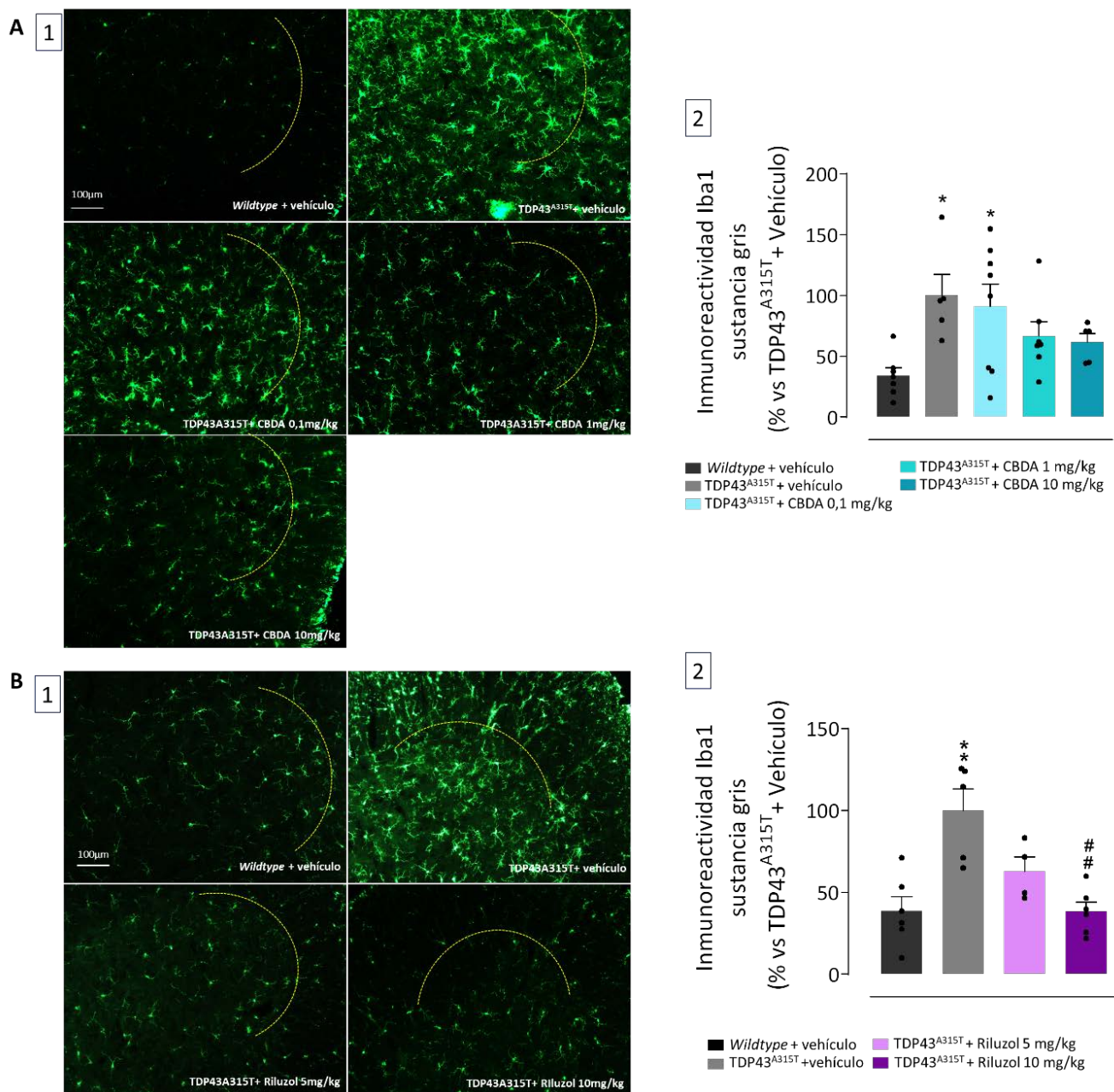
Como cabía esperar, los animales del modelo experimental de ELA presentaron una reducción significativa en el número de MNs con respecto a los animales WT a la edad de 90 días, cuando procedimos a su sacrificio. Únicamente el tratamiento con CBDA a la dosis de 10 mg/kg mostró un efecto protector incrementando el número de MN del asta ventral de la médula espinal de los animales TDP43<sup>A315T</sup>. Sin embargo, el tratamiento con Riluzol no produjo ningún efecto en la supervivencia de las MNs a ninguna de las dos dosis analizadas, a pesar de que podría apreciarse una ligera tendencia en la recuperación de estas (Figura 69-B).

#### Estudio de la activación glial

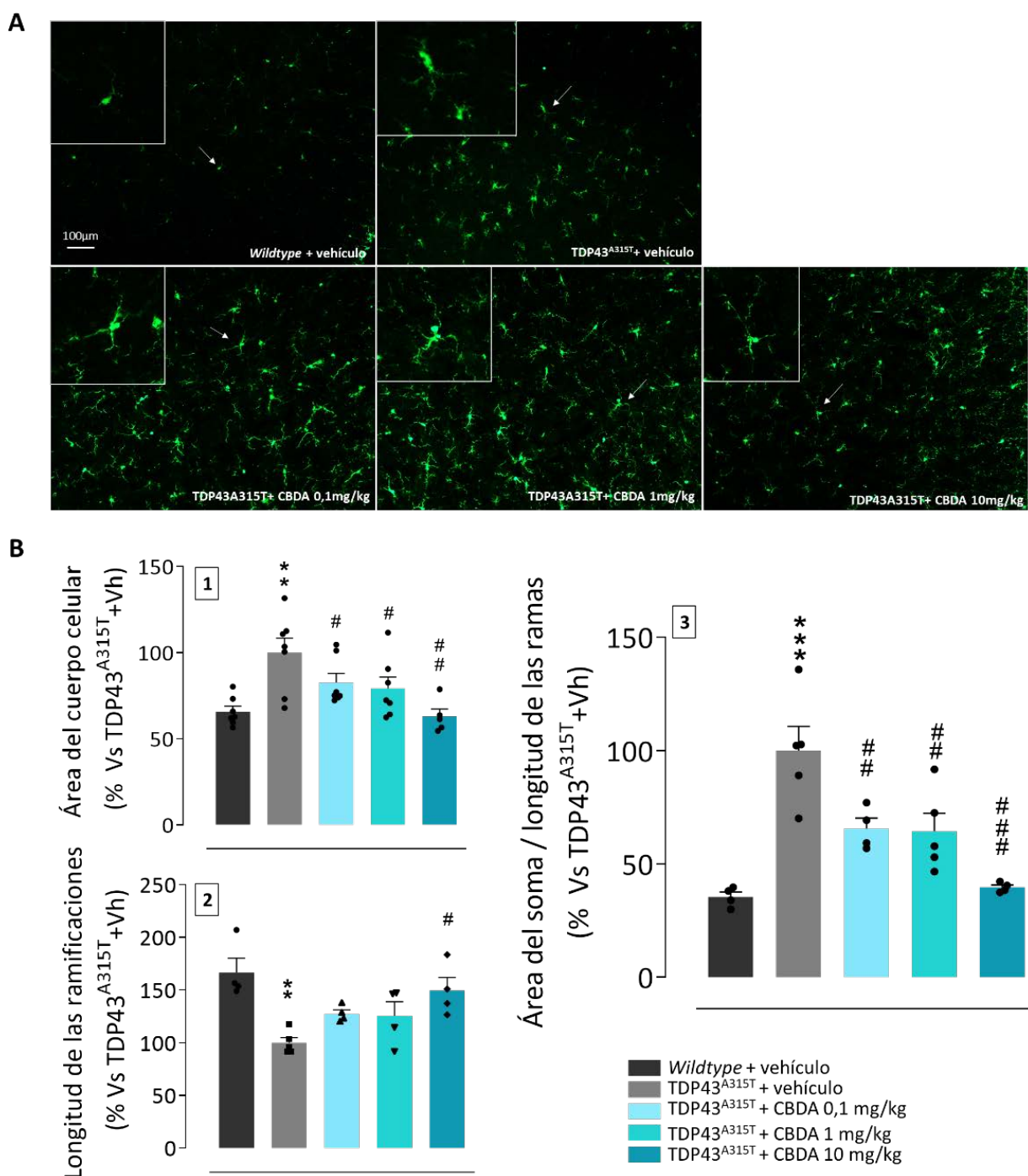
De manera paralela, evaluamos la activación glial que acompaña a la muerte neuronal en estos tejidos, y el efecto que pudiera ejercer cada tratamiento a este nivel. Primero, realizamos una cuantificación de la inmunorreactividad del marcador de microglía IBA-1 (Figura 70). A pesar de la tendencia observada para los tratamientos con las dosis 1 y 10 mg/kg (Figura 70-A2), con una reducción de la microgliosis cercana al 40% en comparación con los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo, ninguna dosis de CBDA fue capaz de revertir significativamente la microgliosis observada en nuestro modelo experimental de ELA, quedando como meras tendencias. Sin embargo, sí se apreció un cambio morfológico importante en este tipo celular con los diferentes tratamientos. Por este motivo, a continuación elaboramos un estudio morfológico de las células de microglía en los diferentes grupos experimentales (Figura 71). En concreto, se pudo confirmar que la microglía de los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo presentaba una morfología de tipo ameboide, con engrosamiento del soma celular y reducción en el tamaño de las prolongaciones. Los tratamientos con CBDA a todas las dosis analizadas produjeron una marcada reducción del área del cuerpo celular con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo (Figura 71-B1). Por otro lado, el tratamiento con la dosis de 10mg/kg de CBDA produjo además un incremento significativo en la longitud de las ramificaciones de las células de microglía de los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo (Figura 71-B2). Ambos parámetros se combinaron para generar la ratio área del soma/longitud de prolongaciones, lo que confirmó nuestras observaciones (Figura 71-B3). Por lo tanto, todos los tratamientos con CBDA tuvieron un efecto beneficioso produciendo un cambio morfológico en las células de microglía en nuestro modelo animal de ELA, siendo la dosis de 10 mg/kg la que mejores resultados mostró. Este cambio morfológico en la microglía se asocia a los procesos antiinflamatorios, por lo que estos resultados nos ratifican los resultados obtenidos anteriormente, en los que vimos cómo el tratamiento farmacológico con el fitocannabinoide CBDA era capaz de modular la activación microglial tanto en experimentos *in vivo* como en cultivos primarios de microglía portadora de TDP43<sup>A315T</sup> y mediante experimentos de citometría de flujo (Diseño Experimental 2).

Por otro lado, en el ensayo farmacológico con dos dosis de Riluzol, sí que observamos un efecto antiinflamatorio de este compuesto reduciendo la activación y reclutamiento de las células de microglía (marcada con IBA-1) a la zona adyacente a las poblaciones de MNs. Este efecto mostró un perfil dosis-dependiente, siendo la dosis de 10 mg/kg la que mejores efectos mostró a este nivel.





**Figura 70.**(A) El tratamiento con CBDA a 1 y 10 mg/kg reduce parcialmente la microgliosis presente en la médula espinal de los ratones TDP43<sup>A315T</sup>. (B) La administración de Riluzol 10mg/kg reduce la microgliosis en los animales TDP43<sup>A315T</sup>. (A-2 y B-2) Cuantificación de la densidad de marcaje de inmunofluorescencia para Iba-1. Se representa el porcentaje de los valores medios de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo. (n=4-8). El análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \*p<0.5; \*\*p<0.01. (\* respecto a los animales WT + Vehículo; # Vs TDP43<sup>A315T</sup> +vh). (A-1 y B-1) Imágenes representativas de cada grupo experimental.

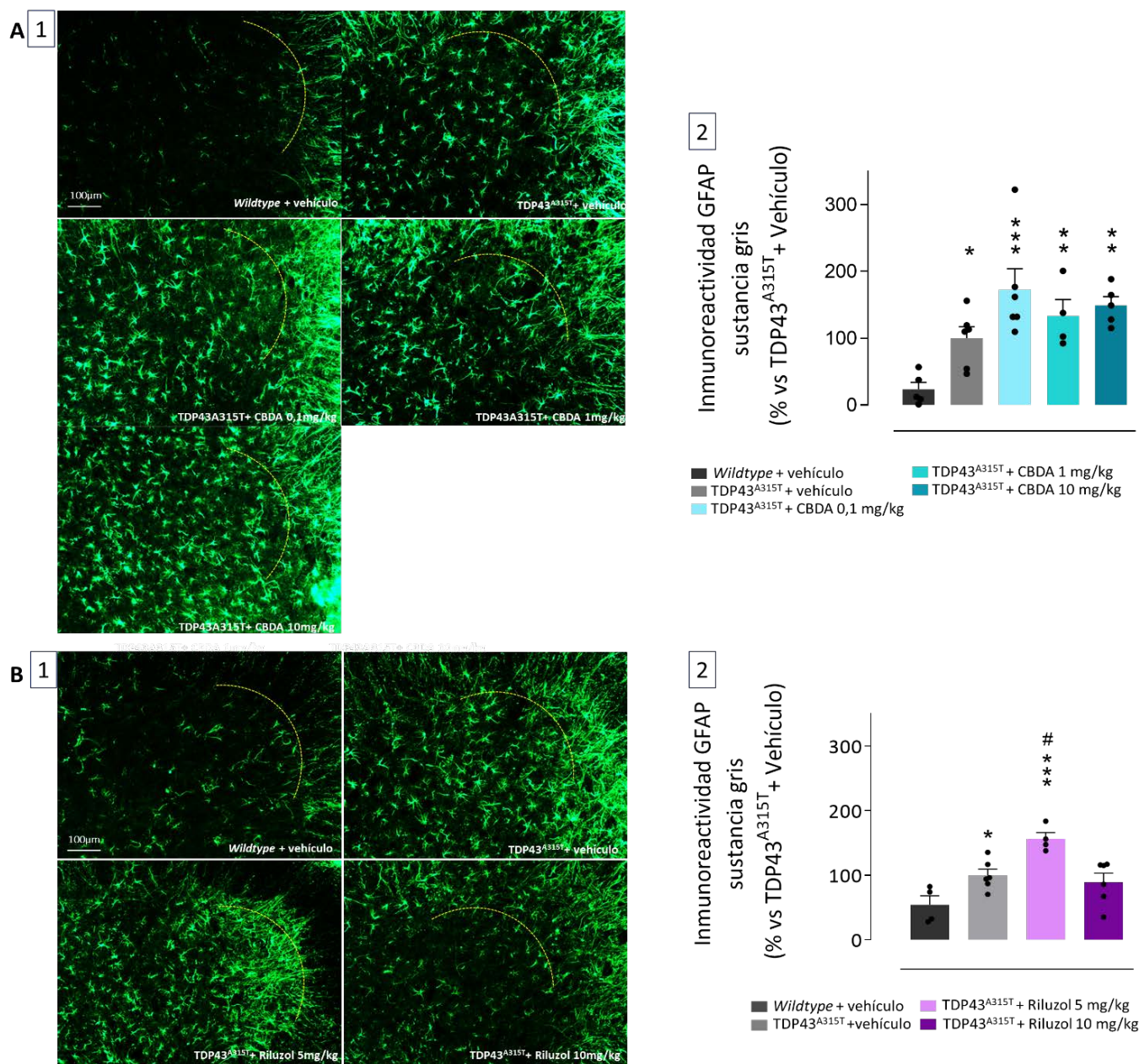


**Figura 71. Análisis morfológico de las células de microglía. (B-1)** Medida del área del soma y **(B-2)** la longitud de las ramificaciones de las células de microglía de la zona ventral de la médula espinal marcadas con IBA-1. **(B-3)** Ratio de tamaño del cuerpo celular frente a la longitud de las ramificaciones. Los valores representan la media del porcentaje de la medida de 16 células en 5 animales de cada grupo experimental  $\pm$  SEM. Se normalizaron los resultados con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> + vehículo. Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . (\* respecto a los animales WT+vehículo; # respecto al grupo TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo). **(A)** Imágenes representativas de cada grupo experimental.

En cuanto a los análisis de activación astrogliar (**Figura 72**), lo primero que observamos fue un incremento de la inmunorreactividad para el marcador GFAP en la médula espinal de los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo respecto a los animales WT. Ninguno de los tratamientos con CBDA a diferentes dosis disminuyó el incremento de astrocitos observado en los animales TDP43<sup>A315T</sup>, y por el contrario, se observó un incremento mayor con respecto a los animales



WT. Observamos un efecto similar cuando administramos Riluzol, con un incremento significativo de la reactividad de GFAP en el caso del tratamiento a dosis de 5 mg/kg y con valores similares a los transgénicos tratados con vehículo con la dosis de 10 mg/kg.



**Figura 72. Ningún tratamiento farmacológico moduló positivamente la astrogliosis observada en los ratones TDP43<sup>A315T</sup> (A-2)(B-2)** Cuantificación de la densidad de marcaje de inmunofluorescencia para GFAP. Se representa la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Los datos mostrados están normalizados con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vh (n=4-6). El análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \*p<0.5; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. (\* Vs WT + Vehículo # Vs TDP43<sup>A315T</sup>+vh). (A-1), (B-1) Imágenes representativas de cada grupo experimental)

## 2. Evaluación de un posible tratamiento combinado CBDA:Riluzol

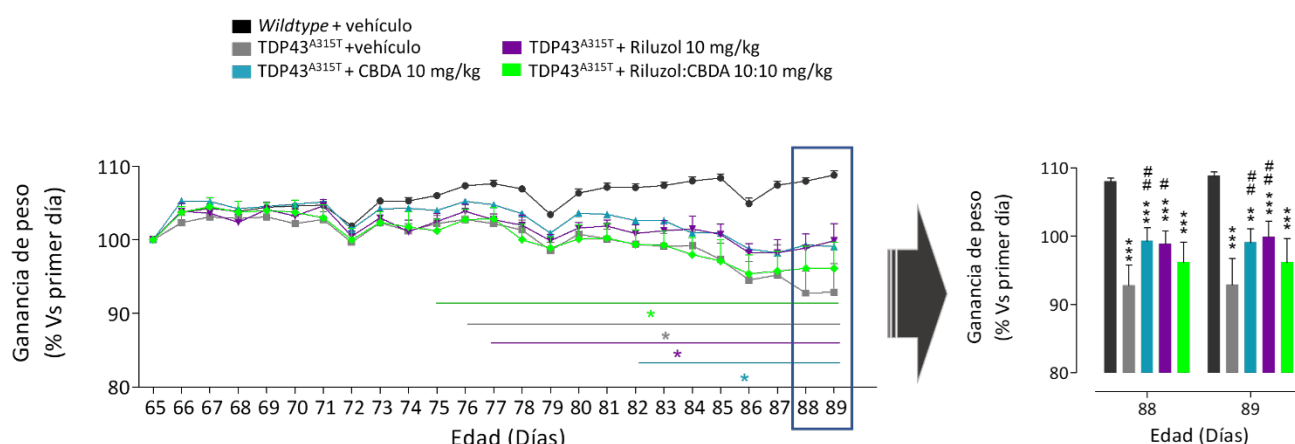
Una vez seleccionadas las dosis efectivas de ambos compuestos, diseñamos un tratamiento crónico en el que combinamos los perfiles de actuación de ambos compuestos, ya que la combinación podría resultar altamente interesante para el tratamiento de la ELA. Para ello, administramos tanto Riluzol como el fitocannabinoide CBDA solos o en combinación, ambos a la dosis de 10mg/kg a los ratones transgénicos TDP43<sup>A315T</sup>.

### Evaluación de la progresión de la enfermedad

#### Análisis de ganancia de peso

A lo largo de todo el experimento, monitorizamos el peso de los animales para obtener el patrón de ganancia de peso corporal, con el fin de determinar el posible efecto del tratamiento farmacológico sobre la pérdida de peso de los animales transgénicos, así como para identificar posibles efectos adversos derivados de este tratamiento (Figura 73).

Los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo mostraron la esperada reducción en la ganancia de peso corporal con respecto a los animales WT a partir del día 76 de edad. La administración de 10mg/kg del fitocannabinoide CBDA mostró cierta capacidad a la hora de retrasar esta disminución de la ganancia de peso, ya que las diferencias significativas con respecto a los controles aparecieron en las fases avanzadas de la sintomatología de tipo ELA, a partir de los 82 días de

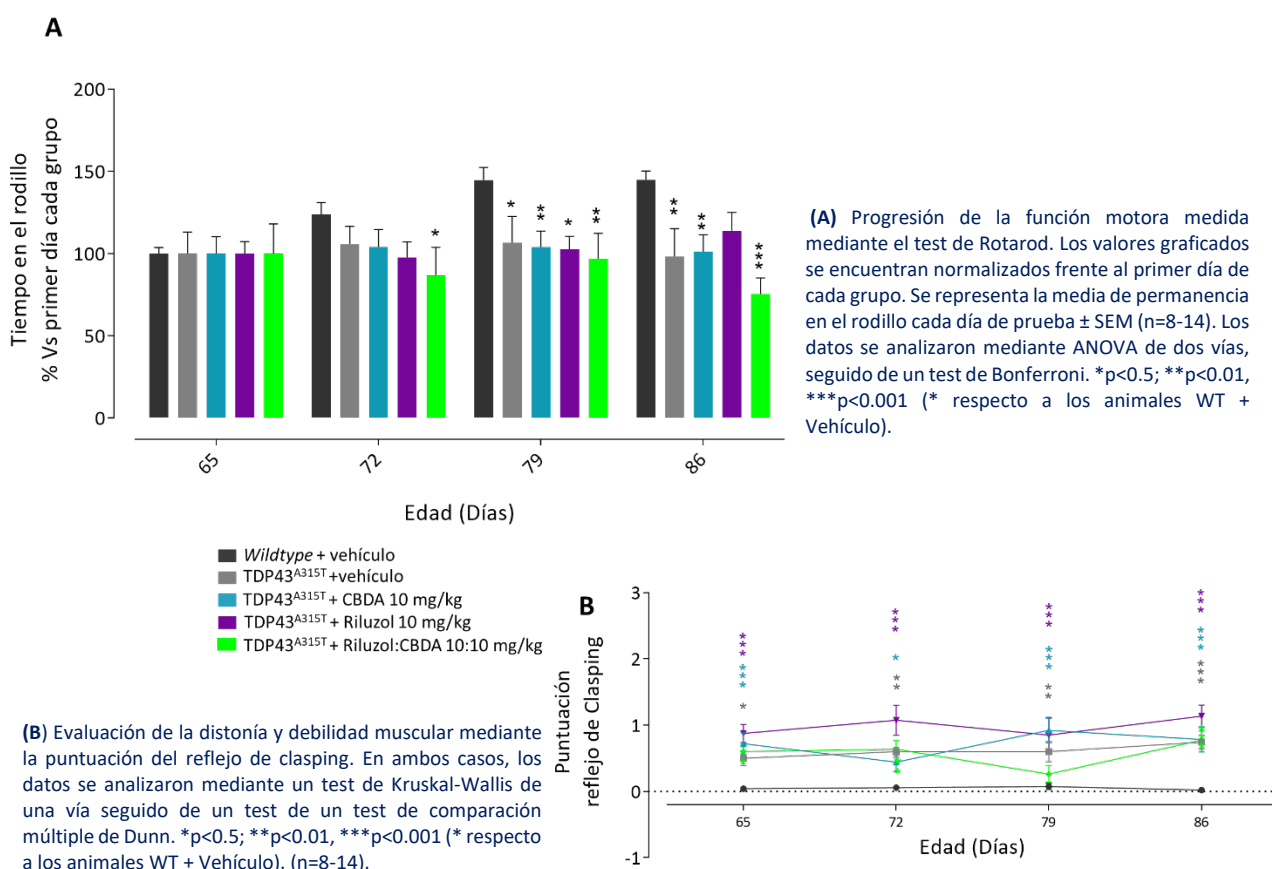


**Figura 73. Estudio del efecto del tratamiento con CBDA y Riluzol, solos o en combinación sobre la ganancia de peso corporal de los animales TDP43<sup>A315T</sup>.** Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM del porcentaje de peso respecto a la media de peso del día 65 de cada grupo experimental (n=8-14). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para valores repetidos, seguido de un test de Bonferroni. \*p<0.5; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 (\* Vs WT+vh; # Vs TDP43<sup>A315T</sup>+vh)

edad. En el caso del Riluzol, también se apreció cierta mejoría en etapas finales del tratamiento con respecto a los animales transgénicos tratados con vehículo. Sin embargo, la administración combinada de ambos compuestos no evidenció ningún efecto aditivo en el parámetro de ganancia de peso de los animales, y, por el contrario, aceleró ligeramente la aparición de diferencias significativas con respecto a los animales control. El resumen estadístico de la Figura 73 se puede consultar en el cuadro S4 del material suplementario.

### Estudio de la funcionalidad motora

Para evaluar la funcionalidad motora, al igual que en anteriores experimentos, llevamos a cabo el test de Rotarod y la evaluación de reflejo del clasp (Figura 74). Los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo mostraron una pérdida de coordinación y fuerza motora a partir del día 79 de edad, resultados esperables en nuestro modelo experimental de ELA, a la vista de los experimentos anteriormente realizados en esta Tesis Doctoral. Únicamente el tratamiento con Riluzol a la dosis de 10 mg/kg mostró cierta eficacia sobre esta disfunción motora, ya que los animales presentaron menor deterioro en la ejecución de la prueba de Rotarod comparados con el grupo control (observándose una pérdida en la significación estadística). Por otro lado, esto no ocurrió con el tratamiento con CBDA a 10 mg/kg, a diferencia de lo visto en experimentos anteriores. La combinación de ambos compuestos no tuvo efectos aditivos en esta prueba, y en cierta forma pareció acelerar la aparición de la disfunción motora en nuestro modelo experimental, ya que observamos mayor nivel de significación estadística.



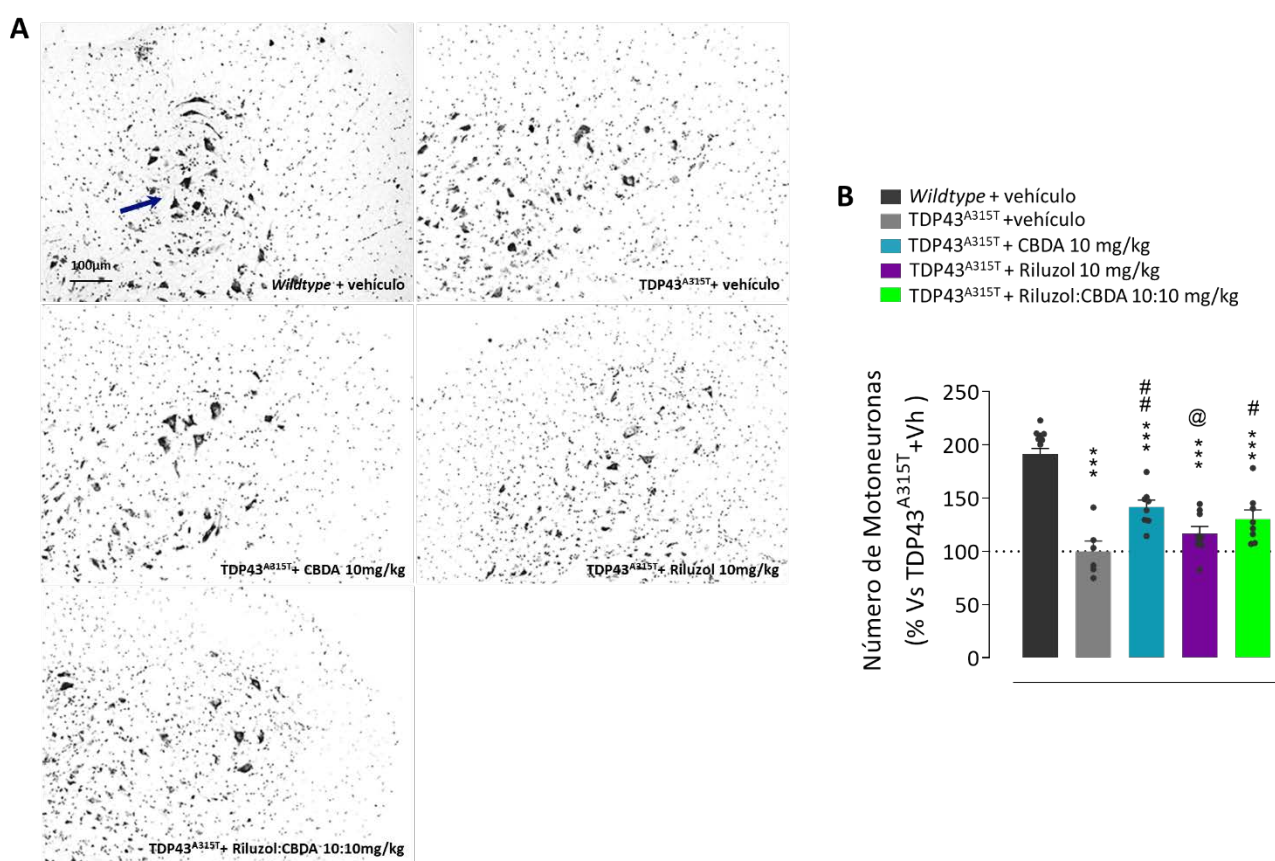
**Figura 74. Efectos funcionales de la administración de CBDA (10mg/kg), Riluzol (10mg/kg) y la combinación de ambos compuestos a los animales TDP43<sup>A315T</sup>.**

Por otro lado, también pudimos comprobar que ninguno de los tratamientos administrados mostró grandes mejoras en la evolución del reflejo de clasp, aunque si pudimos observar un ligero efecto. Así, tras la primera semana de administración de CBDA a 10 mg/kg, los ratones TDP43<sup>A315T</sup> manifestaron una reducción en la puntuación de este reflejo, mientras que la administración combinada de ambos compuestos lo hizo a las dos semanas. Sin embargo, ambos efectos se perdieron con el avance de la enfermedad en nuestro modelo animal.

## Evaluación del daño celular

### Estudio de la supervivencia neuronal

La cuantificación del número de MNs en el asta ventral de la médula espinal mediante la tinción de Nissl (**Figura 75**) mostró que los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo presentaban una reducción de entorno al 50% con respecto a los animales *WT* utilizados como control. A pesar de mostrar un incremento en la supervivencia neuronal más leve que en anteriores ocasiones, el tratamiento con CBDA a la dosis de 10 mg/kg redujo significativamente la pérdida neuronal observada en los animales transgénicos. Por el contrario, la administración de 10mg/kg de Riluzol no mostró eficacia en la reducción de la pérdida neuronal, como observamos en la curva de dosis en el experimento anterior. Sin embargo, el tratamiento combinado de los dos compuestos si mantuvo el efecto neuroprotector en los niveles observados tras el tratamiento con CBDA preservando las MN de la zona lumbar analizada, aunque no se detectó ninguna mejora debida a la combinación de ambos compuestos, en concordancia con los datos observados a nivel de disfunción motora.

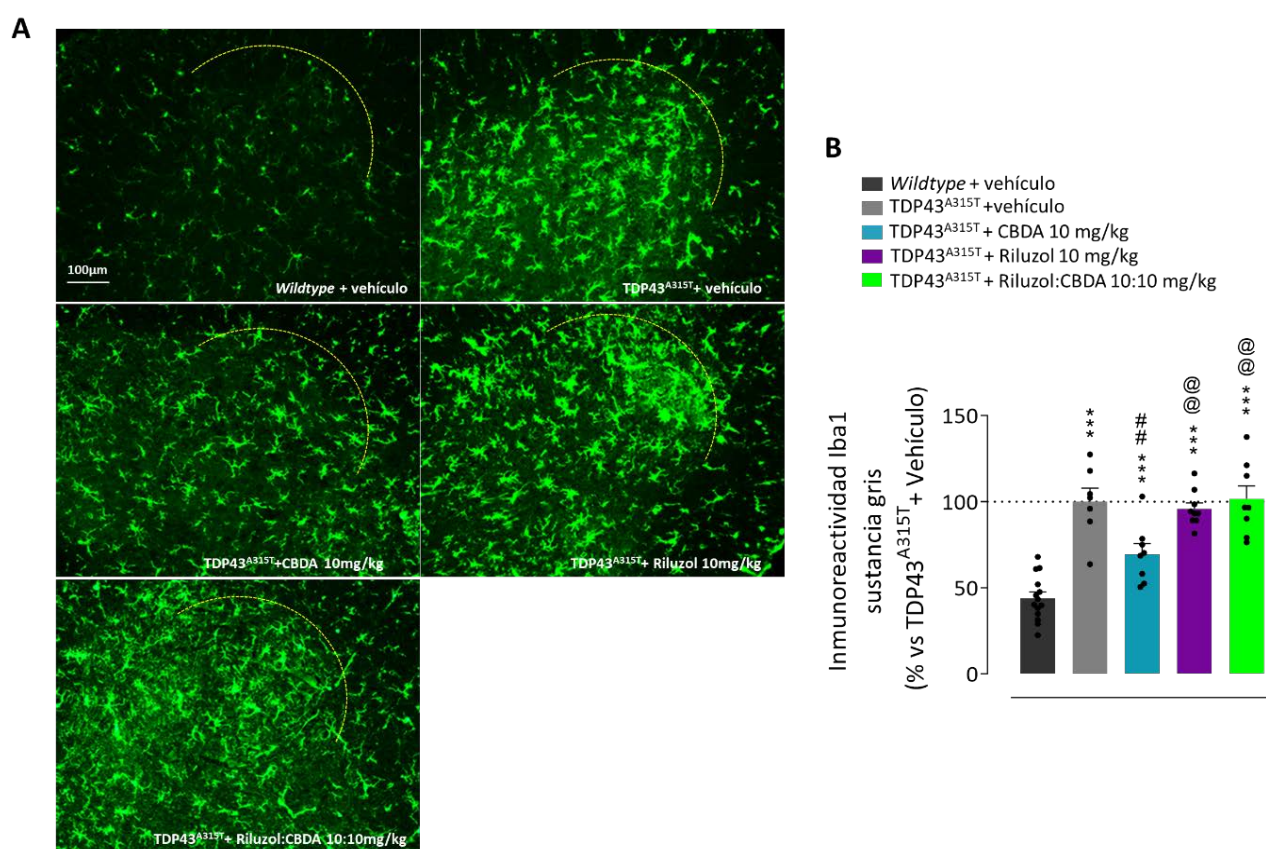


**Figura 75. Efectos de la administración de CBDA (10mg/kg), Riluzol (10mg/kg) y la combinación de ambos compuestos en la supervivencia de las MNs de la médula espinal de los animales TDP43<sup>A315T</sup>** (A) Cuantificación de MNs teñidas con la tinción de Nissl. Los valores corresponden a la media de cada grupo  $\pm$  SEM (n=8-10). Los datos se representan en porcentaje con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo. Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*p<0.5; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. (\* respecto a los animales *WT*+vehículo, # respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo y @ respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> +CBDA 10mg/kg). (B) Imágenes representativas de cada grupo experimental.



### Estudio de la activación glial

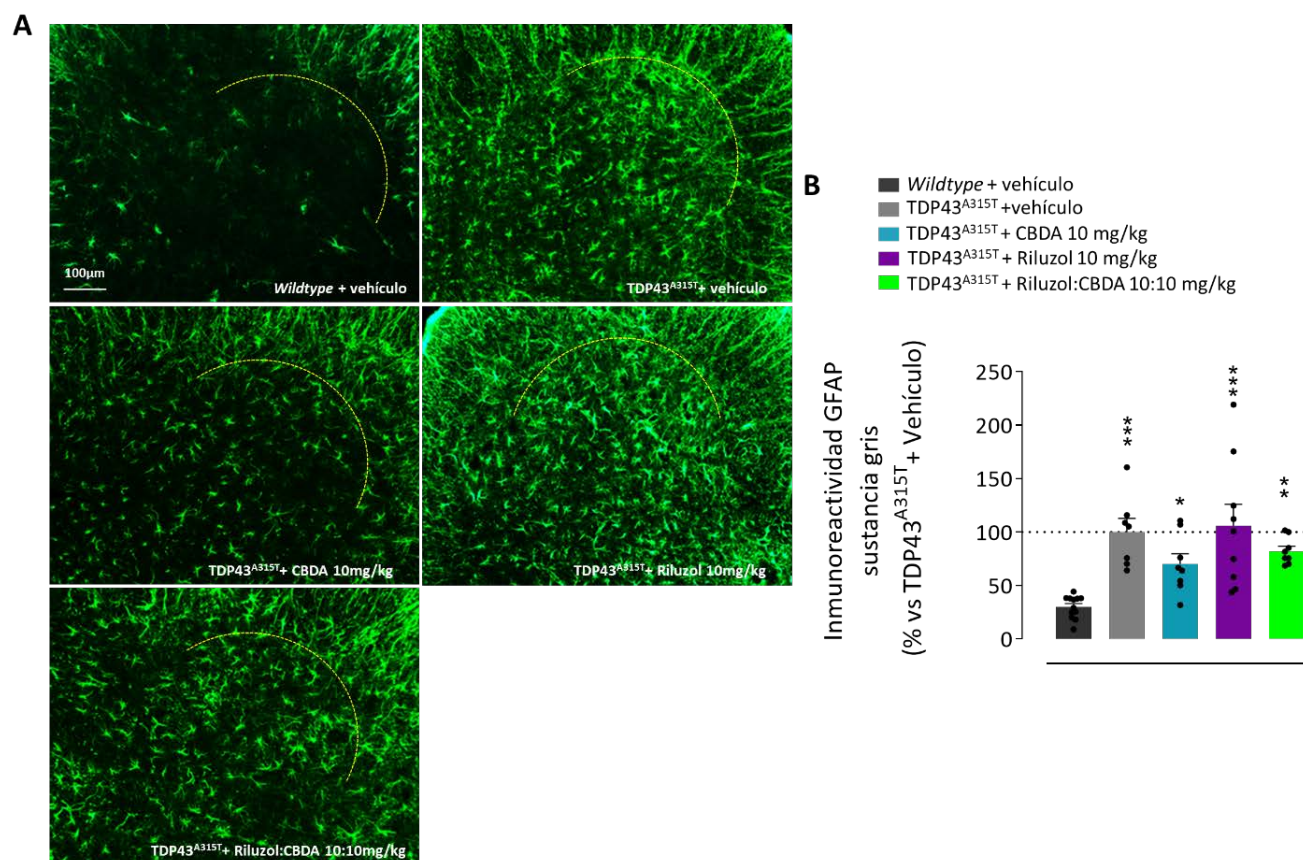
Nuevamente, para el estudio del estado de las células de glía llevamos a cabo análisis por inmunotinción de astrocitos y células de microglía con los marcadores GFAP e Iba-1 respectivamente. En el momento del sacrificio, los animales TDP43<sup>A315T</sup> presentaron un incremento significativo de la microgliosis en la médula espinal (**Figura 76**). Únicamente la administración crónica del fitocannabinoide CBDA a las dosis de 10mg/kg mostró una reducción significativa de esta reactividad microglial. A pesar de los resultados obtenidos en el tratamiento farmacológico anterior, el fármaco Riluzol no ejerció ningún efecto beneficioso sobre la neuroinflamación presente en nuestro modelo experimental, y tampoco la administración de ambos compuestos conjuntamente generó un mayor efecto sobre la microgliosis, perdiéndose incluso el efecto positivo observado con la administración individual de CBDA a 10mg/kg.



**Figura 76. Efecto tras la administración de CBDA (10mg/kg), Riluzol (10mg/kg) o la combinación de ambos compuestos en la activación microglial de los animales TDP43<sup>A315T</sup>.** (A) Cuantificación de la densidad de marcaje para Iba-1. Se representa la media de medios de cada grupo  $\pm$  SEM. (n=8-13). Los resultados se normalizaron con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo. El análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \*\*p<0.01. (Vs WT +vh; # Vs TDP43<sup>A315T</sup> +vh; @ Vs TDP43<sup>A315T</sup> +CBDA 10mg/kg). (B) Imágenes representativas de cada grupo experimental.

Por otro lado, también evaluamos la astrogliosis presente en estos animales al finalizar el tratamiento farmacológico (**Figura 77**). De nuevo, nuestro modelo experimental presenta altos niveles de expresión de la proteína GFAP en etapas avanzadas de la enfermedad. El tratamiento con CBDA 10mg/kg fue capaz de reducir parcialmente este incremento de la astrogliosis, observándose la reducción de dos niveles de significación con respecto a los animales WT, mientras que el tratamiento con Riluzol no presentó ningún efecto beneficioso en la reducción de la astrogliosis. Por último, la combinación

de ambos compuestos mostró una ligera tendencia a reducir los niveles de GFAP, aunque esta fue menos evidente que en el caso de los animales a los que se le administró únicamente CBDA 10 mg/kg.



**Figura 77. Efecto sobre la astrogliosis de la administración de CBDA (10mg/kg), e Riluzol (10mg/kg) o la combinación de ambos compuestos a los animales TDP43<sup>A315T</sup>.** (A) Cuantificación de la densidad de marcaje para GFAP. Se representa la media de cada grupo  $\pm$  SEM (n=8-13). Los datos mostrados están normalizados con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vh. El análisis de datos utilizado es un ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. \*p<0.5; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. (\* Vs WT + Vehículo). (B) Imágenes representativas de cada grupo experimental.

Como luego se abordará en la discusión, este experimento de combinación de los dos compuestos no ha permitido confirmar un efecto sumatorio entre ambos, todo lo contrario. Además, arroja ciertas dudas sobre el potencial de ambos compuestos administrados de forma individual. Principalmente lo hace en cuanto al efecto del Riluzol que, en este experimento, fue inexistente a pesar de ciertas tendencias detectadas en la curva de dosis. En cualquier caso, el Riluzol siempre ha sido un agente con mínima eficacia en los estudios preclínicos conducidos en animales mutantes para SOD1<sup>518</sup>, y esto parece que también ocurre en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>. En segundo lugar, este experimento también arroja ciertas dudas sobre el potencial del fitocannabinoide CBDA, ya que en los experimentos anteriores (Tanto en el Diseño Experimental 2 como en la curva de dosis de este Diseño Experimental) alcanzó mayor nivel de eficacia. En descargo de esto, se debe indicar que esto pueda deberse a problemas de estabilidad de este compuesto, que fácilmente se transforma en otras moléculas químicas, entre ellas en CBD, fitocannabinoide que, en nuestros estudios, demostró menor eficacia (Ver más detalle sobre esta cuestión en la Discusión).

# Diseño experimental 4: Implicación del SEC en modelos experimentales de ELA en *C. elegans*.

Una de las limitaciones que existe en la búsqueda de tratamientos en la ELA es, debido a su gran heterogeneidad, las restricciones existentes en los modelos animales disponibles, ya que no existen modelos que mimeticen a nivel global la fisiopatología de esta enfermedad, y solo desarrollan aspectos parciales de su compleja patogénesis. Durante muchos años el único modelo murino utilizado fue el basado en la mutación en la SOD1. Aunque en la actualidad hay varios modelos murinos disponibles, como el basado en la mutación TDP43 utilizado durante esta Tesis doctoral, ciertos aspectos del desarrollo de la patología no pueden ser estudiados en detalle con ellos, como por ejemplo la degeneración muscular. Debido a ello, la oportunidad de acercarnos a otros modelos experimentales resultó de gran interés en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Algunos de los modelos experimentales que actualmente están cobrando protagonismo son los modelos basados en el nemátodo *C. elegans*. Por su simplicidad estructural y su fácil modificación genética, estos animales son modelos experimentales muy útiles, y están adquiriendo cada vez más importancia en el ámbito de la investigación de las END y, sobre todo, en el cribado farmacológico. Por este motivo, en el marco de una estancia breve en un laboratorio dirigido por la Dra. Liachko, Profesora adjunta en la División de Gerontología y Medicina Geriátrica de la Universidad de Washington, Seattle (EE.UU.), facilitada por el contrato FPI, que nos pareció una excelente oportunidad poder aplicar nuestros conocimientos sobre el SEC en estos modelos de ELA.

De los diferentes modelos de *C. elegans* disponibles en el laboratorio de la Dra. Liachko, seleccionamos dos modelos de ELA basados en la inserción de la proteína humana TDP43 con las mutaciones A315T y M337V en el genoma del nemátodo. Estas dos mutaciones se localizan en el lado C-terminal de la proteína TDP43, en el residuo rico en glicina, y son dos de las mutaciones genéticas más comunes entre los pacientes de ELA que presentan mutaciones en la proteína TDP43. Debido a que este modelo experimental era nuevo para nosotros, antes de la caracterización de sistema de señalización de tipo endocannabinoide (SSEC) en estos animales, evaluamos tanto el fenotipo del modelo como otras características fisiopatológicas que se desarrollan en la ELA y que no se estaban caracterizadas previamente en estos animales.

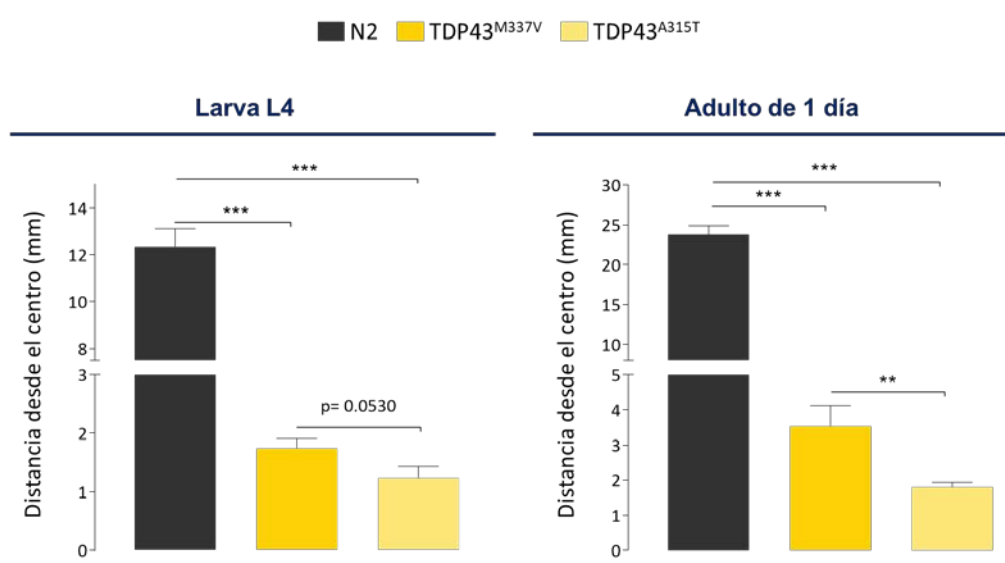
## 1. Caracterización funcional de dos modelos experimentales de ELA en el nemátodo *C. elegans*

### Evaluación comportamental de los modelos mediante el estudio de la actividad locomotora.

Con el fin de evaluar las alteraciones a nivel motor en los dos modelos experimentales, llevamos a cabo la prueba de comportamiento de locomoción radial, en el que medimos la distancia que recorren los nemátodos desde el centro de la

placa en un determinado periodo de tiempo. Para ello, efectuamos la medida en dos periodos temporales, 1 hora después de iniciar la prueba y a las 24 horas, periodos que corresponden a las etapas de desarrollo de larva L4 y adulto de un día, respectivamente. Estas etapas de desarrollo de los nemátodos corresponden con la etapa sintomática en ambos modelos experimentales.

Como podemos observar en la **Figura 78**, ambos modelos experimentales de nemátodos con las diferentes mutaciones de la proteína humana TDP43 presentaron una disminución significativa en la distancia recorrida con respecto a los animales de la cepa *WT* N2 utilizados como control. Además, encontramos diferencias entre las dos cepas transgénicas utilizadas, con los animales con la inserción de TDP43<sup>A315T</sup> mostrando un fenotipo motor más severo con respecto al modelo basado en la inserción de la mutación M337V. Estas diferencias se observan a las dos edades estudiadas, aunque son más evidentes en la etapa más avanzada, adulto de un día, donde alcanzan claramente significación estadística.



**Figura 78. Déficit motor analizado en la prueba de locomoción radial en los nemátodos que presentan la inserción de la TDP43 humana mutada.** Los resultados muestran datos combinados de múltiples experimentos. Se representa la media  $\pm$  SEM. N2 ( $n=166$ ), TDP43<sup>M337V</sup> ( $n=129$ ); TDP43<sup>A315T</sup> ( $n=130$ ) \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ . La significancia estadística se determinó usando el test de la  $t$  de Student de dos colas.

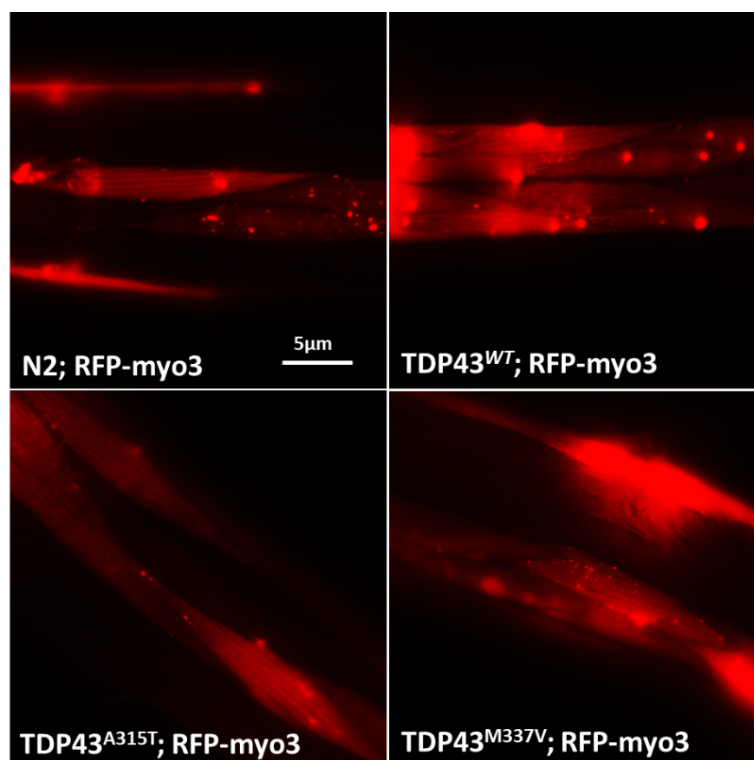
## Análisis del músculo esquelético

De manera complementaria a las pruebas funcionales, se llevó a cabo un estudio del tejido muscular en estos animales, ya que como se ha comentado al inicio de este Diseño Experimental, los modelos experimentales de ELA desarrollados en *C. elegans* pueden ser de gran utilidad a este respecto. Por un lado, se realizó un análisis morfológico de la estructura muscular mediante técnicas de microscopía *in vivo*. Por otro lado, realizamos un estudio más detallado de la estructura y funcionalidad del músculo esquelético de estos animales mediante el análisis molecular de diferentes marcadores musculares mediante la técnica de qPCR.



### Análisis histológicos del músculo esquelético

En vista de los resultados obtenidos en los ensayos de locomoción radial, se generaron, como herramientas, varios modelos de animales transgénicos con el fin de evaluar estructuralmente el tejido muscular de los animales. Para ello, cruzamos animales que presentaban las mutaciones para TDP43<sup>A315T</sup> y TDP43<sup>M337V</sup> con animales que expresaban la proteína muscular estructural MYO-3, ortólogo de la cadena pesada de la miosina humana, con marcaje fluorescente rojo (RFP-MYO-3). Adicionalmente, generamos un animal que presentaba una sobreexpresión de la proteína TDP43 humana sin alteraciones genéticas (TDP43<sup>WT</sup>). Antes de utilizar el modelo animal con marcaje RFP-MYO-3, analizamos los niveles de



**Figura 79. Micrografías *in vivo* de la pared muscular de los nemátodos.**

expresión de ARNm de myo-3 en las diferentes cepas de nemátodos, para confirmar que no existía ninguna diferencia de expresión entre nuestros grupos experimentales (Figura S7). Tras un análisis observacional de las muestras de nemátodo completo de los diferentes modelos experimentales, no encontramos diferencias en la estructura del sarcómero entre los animales transgénicos y los animales N2 con la inserción de la proteína fluorescente MYO-3 a la edad seleccionada (Figura 79).

### Estudio de marcadores musculares

Asimismo, se analizaron diferentes marcadores musculares, centrándonos principalmente en aquellos marcadores cuyas alteraciones provocan defectos neuromusculares y atrofia de la fibra muscular<sup>540–544</sup>. Para nuestro estudio, se seleccionaron dos etapas de desarrollo diferentes: por un lado, se analizaron los niveles de ARNm en muestras de individuos en el estadio de adulto de un día, periodo equivalente a la segunda etapa de las pruebas comportamentales, y, por lo tanto, etapa sintomática de ambos modelos; Por otro lado, se analizaron los mismos marcadores en etapas de desarrollo previas a la aparición de la sintomatología motora en el periodo larvario L2/L3. En todos los marcadores analizados los resultados se compararon con la cepa WT N2 en las respectivas edades.

### Estudio de marcadores de la funcionalidad muscular

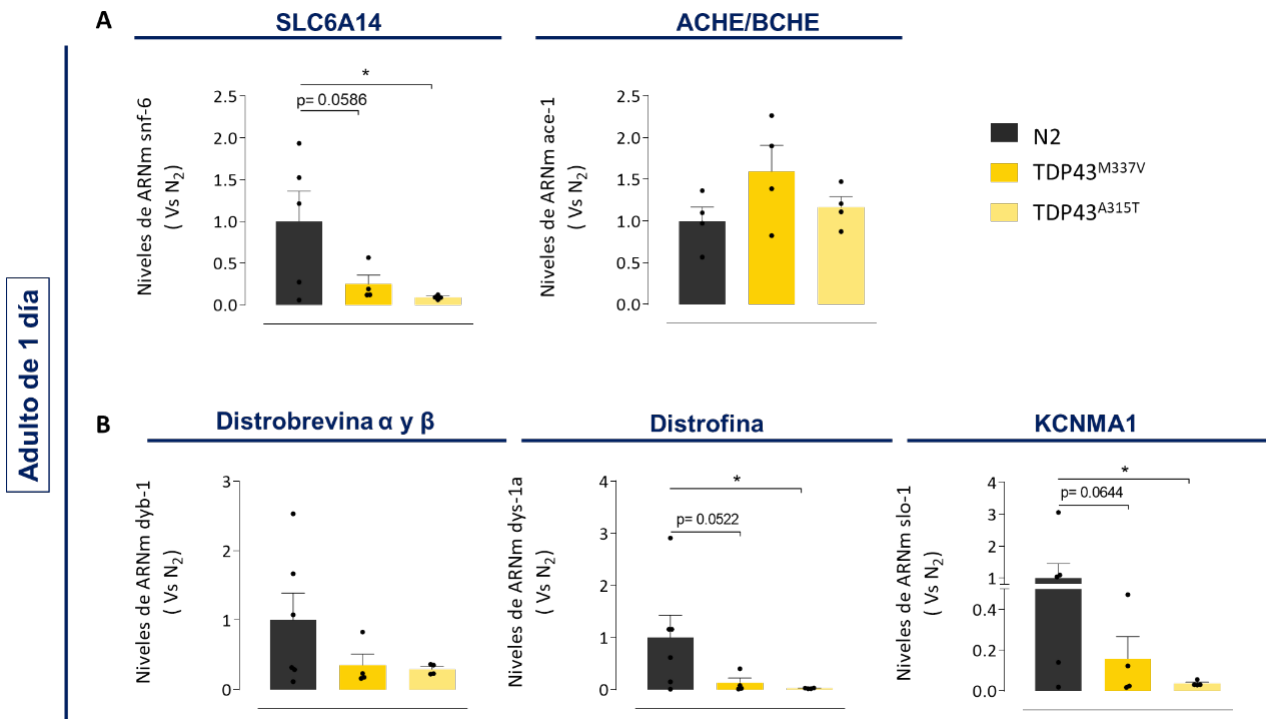
Para estudiar la funcionalidad muscular analizamos marcadores de los procesos de metabolismo y transporte de la acetilcolina (ACh), principal NT implicado en la contracción muscular. Para ello, seleccionamos un transportador de ACh a través de la membrana celular, denominado SNF-6, y la enzima responsable de la degradación de ésta, la ACE-1.

El transportador SNF-6 es un ortólogo del canal iónico SLC6A14 humano y en estos animales funciona como transportador transmembrana de acetilcolina y colina, participando en los procesos de recaptura de la ACh liberada a la brecha sináptica. Por lo tanto, este transportador ejerce un papel importante en la regulación de la locomoción. Además, analizamos los niveles de expresión del gen *ace-1*, que codifica para una proteína con actividad AChE. Esta proteína se encarga de la degradación de la ACh, participando así en la regulación de la locomoción. En la etapa adulta, ambas cepas de animales transgénicos mostraron una tendencia a disminuir los niveles de ARNm en el transportador de recaptura de ACh, *snf-6*. Sin embargo, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el caso de los animales con la inserción de la proteína mutada TDP43<sup>A315T</sup>, el modelo de fenotipo más severo. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de *ace-1* en ninguna de las cepas de nemátodo transgénicas (Figura 80).

| Snf-6  |                |         |         |
|--------|----------------|---------|---------|
| Grupos |                | P valor | Resumen |
| N2     | TDP-43 (M337V) | 0,1302  | ns      |
| N2     | TDP-43 (A315T) | 0,1441  | ns      |
| Ace-1  |                |         |         |
| Grupos |                | P valor | Resumen |
| N2     | TDP-43 (M337V) | 0,2799  | ns      |
| N2     | TDP-43 (A315T) | 0,4681  | ns      |
| Dyb-1  |                |         |         |
| Grupos |                | P valor | Resumen |
| N2     | TDP-43 (M337V) | 0,2476  | ns      |
| N2     | TDP-43 (A315T) | 0,3743  | ns      |
| Dys-1a |                |         |         |
| Grupos |                | P valor | Resumen |
| N2     | TDP-43 (M337V) | 0,2579  | ns      |
| N2     | TDP-43 (A315T) | 0,4903  | ns      |
| Slo-1  |                |         |         |
| Grupos |                | P valor | Resumen |
| N2     | TDP-43 (M337V) | 0,2227  | ns      |
| N2     | TDP-43 (A315T) | 0,4972  | ns      |

**Tabla 18. Evaluación de los niveles de marcadores de funcionalidad muscular en el nemátodo *C. elegans* en la etapa de desarrollo larva L2-L3.** Datos analizados mediante una *t* de Student de una cola con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. (n=4-5).

A continuación, analizamos los niveles de ARNm de elementos relacionados con el mantenimiento de la integridad de las sinapsis colinérgicas en *C. elegans*. Para ello, seleccionamos *dyb-1*, un ortólogo de las distrobrevinas  $\alpha$  y  $\beta$  humanas, la isoforma a de *dys-1*, un ortólogo de la distrofina humana y *slo-1*, un ortólogo del canal humano KCNMA1. Todas estas proteínas de unión al citoesqueleto tienen un papel relevante en la correcta organización del sarcómero en *C. elegans*. Además, estos tres elementos forman parte de lo que se conoce como el complejo de glicoproteínas de distrofina (DGC, por sus siglas en inglés), un complejo multiproteico implicado en el mantenimiento y estabilización de las sinapsis colinérgicas<sup>544</sup>. En los estadios larvarios L2/L3 no se encontraron diferencias significativas entre los animales transgénicos TDP43 con respecto a los animales N2 en ninguno de los elementos analizados (Tabla 18). Sin embargo, como podemos observar en la Figura 80, en la etapa adulta, ambas cepas de animales transgénicos mostraron una tendencia a disminuir en los niveles de ARNm de todos los elementos del DGC, observándose significación estadística con respecto a la cepa N2 en el caso de los animales TDP43<sup>A315T</sup> en la isoforma a de la distrofina (DYS-1a) y el transportador iónico SLO-1. En el caso de los animales TDP43<sup>M337V</sup>, a pesar de las fuertes tendencias observadas, no encontramos diferencias significativas.



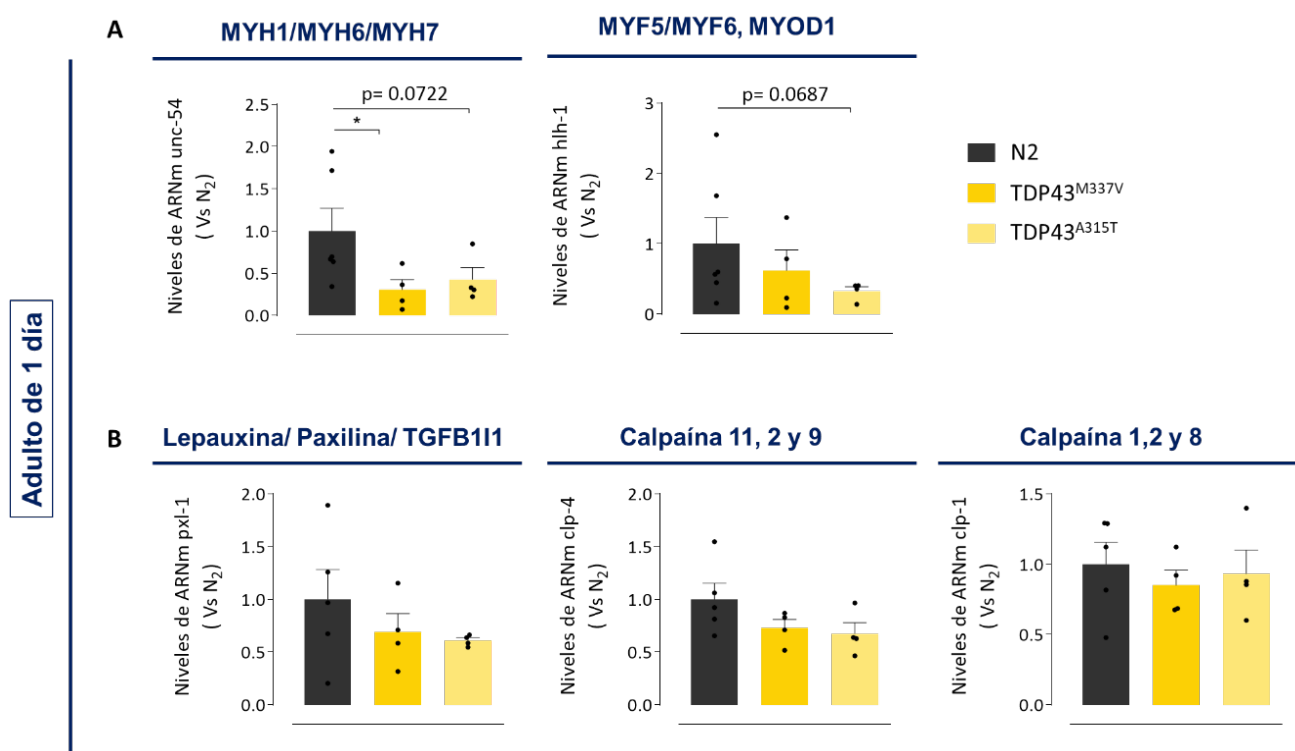
**Figura 80. (A) Disfunción de la recaptura de acetilcolina en el estadio adulto de los nemátodos TDP43<sup>A315T</sup> y TDP43<sup>M337V</sup>.** Niveles de expresión de ARNm de elementos de regulación de la locomoción. **(B) Alteración del mantenimiento de la integridad de la fibra muscular por el complejo de glicoproteínas de distrofina en los nemátodos TDP43<sup>A315T</sup> y TDP43<sup>M337V</sup>.** Niveles de expresión de ARNm de elementos de regulación de la homeostasis celular y organización del sarcómero. Los valores representados son las medias de cada grupo experimental  $\pm$  SEM (n=5). El análisis de datos utilizado es una *t* de Student de una cola con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \* $p < 0.05$ .

### Estudio de marcadores estructurales

A continuación, a pesar de que no observamos alteraciones estructurales en la fibra muscular (**Figura 79**), analizamos el estado de algunos marcadores estructurales de la fibra muscular. Para ello, seleccionamos UNC-54, un ortólogo de las isoformas de la cadena pesada de la miosina humana MYH1, MYH6 y MYH7, y un factor de transcripción implicado en los procesos de diferenciación celular, ortólogo de diferentes isoformas de factores miogénicos humanos (MYF5, MYF6, MYOD1), el HLH-1. (**Figura 81**).

De nuevo, en la etapa adulta, los animales transgénicos de ambos modelos de ELA mostraron una reducción en los niveles de expresión de *unc-54*, aunque solo mostró diferencias estadísticamente significativas el modelo experimental basado en la mutación M337V. En el caso de los niveles de expresión del factor miogénico *hlh-1*, no encontramos diferencias significativas entre los animales transgénicos y los animales N2, aunque sí cierta tendencia en el caso de los animales portadores de la mutación A315T.

Por último, analizamos los niveles de expresión de otros elementos responsables de la homeostasis muscular. Seleccionamos el ortólogo de la leupaxina/paxilina, *pxl-1*, encargado del desarrollo de la estructura muscular, y dos ortólogos de diferentes isoformas de la calpaína humana, *clp-1* y *clp-4*, responsables en nemátodos del mantenimiento de la homeostasis de la célula muscular y que además participan en la regulación de la organización del sarcómero. Como podemos observar en la **Figura 81**, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de estos elementos de regulación analizados.



**Figura 81. Análisis de marcadores estructurales del músculo esquelético de los nemátodos modelo de ELA. (A)** Niveles de expresión de ARNm de elementos estructurales y de diferenciación celular del músculo esquelético. **(B)** Niveles de expresión de ARNm de elementos de regulación de la homeostasis celular y organización del sarcómero. Los valores representados son las medias de cada grupo experimental  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). EL análisis de datos utilizado es una *t* de Student de una cola con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \* $p < 0.05$ .

## 2. Caracterización molecular del SSEC en los dos modelos de ELA de *C. elegans*

Además de aprovechar el enorme valor formativo de las diferentes actividades desarrolladas en estos modelos de *C. elegans* durante mi estancia predoctoral en la Universidad de Washington en Seattle (EE.UU.), los experimentos en nemátodos se diseñaron con el objetivo de estudiar el SEC. Por este motivo, llevamos a cabo la caracterización lo más completa posible de diferentes elementos involucrados en la señalización endocannabinoide en estos modelos de ELA en invertebrados. Para ese objetivo, seleccionamos de nuevo dos periodos temporales. Por un lado, elegimos la etapa de desarrollo de larva L2-L3, correspondiente a estadios larvarios tempranos, en los que todavía no hay alteraciones comportamentales. Por otro lado, seleccionamos animales en el estadio adulto temprano o adulto de un día, momento en el que los animales ya muestran la disfunción motora esperable en un modelo experimental de ELA. Nuevamente, como individuos control, utilizamos la cepa de nemátodo N2 de fenotipo WT.

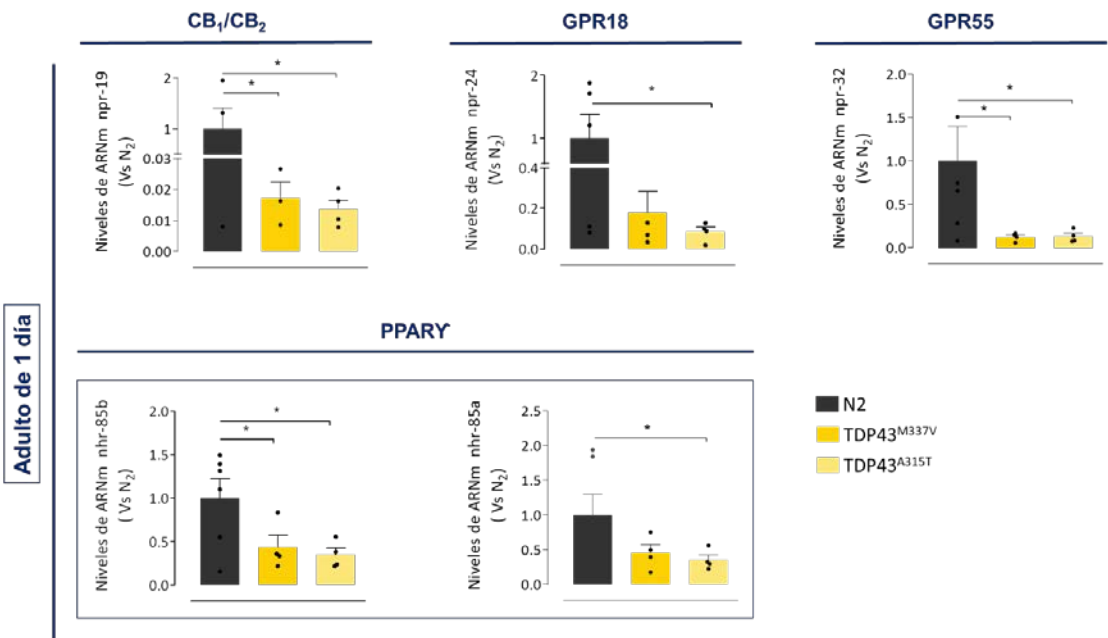
Receptores del SSEC

Para determinar una posible desregulación de los elementos análogos del SEC de mamífero en nemátodo, primero, analizamos los niveles de expresión de los principales receptores con actividad cannabinoide. Para ello, seleccionamos los receptores mediante los cuales la AEA y el 2-AG ejercen sus funciones fisiológicas en el organismo de estos animales, como la reproducción y el desarrollo embrionario, la regulación de la conducta aversiva, el metabolismo lipídico o el control de la navegación axonal. De manera adicional, seleccionamos el receptor NHR-85 ya que es ortólogo del receptor PPARY, por su implicación en algunos procesos que ejercen los ECs en mamíferos.

Como podemos observar en la **Figura 84**, observamos una fuerte tendencia a la disminución de los niveles de expresión en todos los receptores relacionados con el sistema de señalización de tipo endocannabinoide en nemátodos. Así, encontramos en ambos modelos de ELA en nemátodo alteraciones en la expresión de los receptores NPR-19 (CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>), NPR-32 (GRP55) y en las dos isoformas analizadas de NHR-85 (PPARY). En el caso de los animales TDP43<sup>M337V</sup>, observamos diferencias estadísticamente significativas en todos los casos a excepción de ARNm del

| Npr-19 (ortólogo de CB <sub>1</sub> /CB <sub>2</sub> ) |                |         |         |
|--|----------------|---------|---------|
| Grupos   |                | P valor | Resumen |
| N2   | TDP-43 (M337V) | 0,3127  | ns      |
| N2   | TDP-43 (A315T) | 0,0436  | *       |
| Npr-24 (ortólogo de GPR18)                             |                |         |         |
| Grupos   |                | P valor | Resumen |
| N2   | TDP-43 (M337V) | 0,2845  | ns      |
| N2   | TDP-43 (A315T) | 0,1493  | ns      |
| Npr-32 (Ortólogo de GPR55)                             |                |         |         |
| Grupos   |                | P valor | Resumen |
| N2   | TDP-43 (M337V) | 0,3096  | ns      |
| N2   | TDP-43 (A315T) | 0,1931  | ns      |
| Nhr-85a (ortólogo de PPARY)                            |                |         |         |
| Grupos   |                | P valor | Resumen |
| N2   | TDP-43 (M337V) | 0,4210  | ns      |
| N2   | TDP-43 (A315T) | 0,2326  | ns      |
| Nhr-85b (ortólogo de PPARY)                            |                |         |         |
| Grupos   |                | P valor | Resumen |
| N2   | TDP-43 (M337V) | 0,4560  | ns      |
| N2   | TDP-43 (A315T) | 0,2165  | ns      |

**Tabla 19. Evaluación de los niveles de receptores celulares relacionados con el SSEC en el nemátodo *C. elegans* en la etapa de desarrollo larva L2-L3.** Datos analizados mediante una *t* de Student de una cola con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. (n=4-5).



**Figura 82. Evaluación de los niveles de receptores celulares relacionados con el SSEC en el nemátodo *C. elegans*** Niveles de expresión de ARNm de elementos del SSEC. Los valores representados son las medias de cada grupo experimental  $\pm$  SEM (n=5). EL análisis de datos utilizado es una *t* de Student de una cola con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \**p* < 0.05

receptor NPR-24, el ortólogo del receptor GPR18 humano. Esta reducción no se apreció en las muestras de estadio larvario

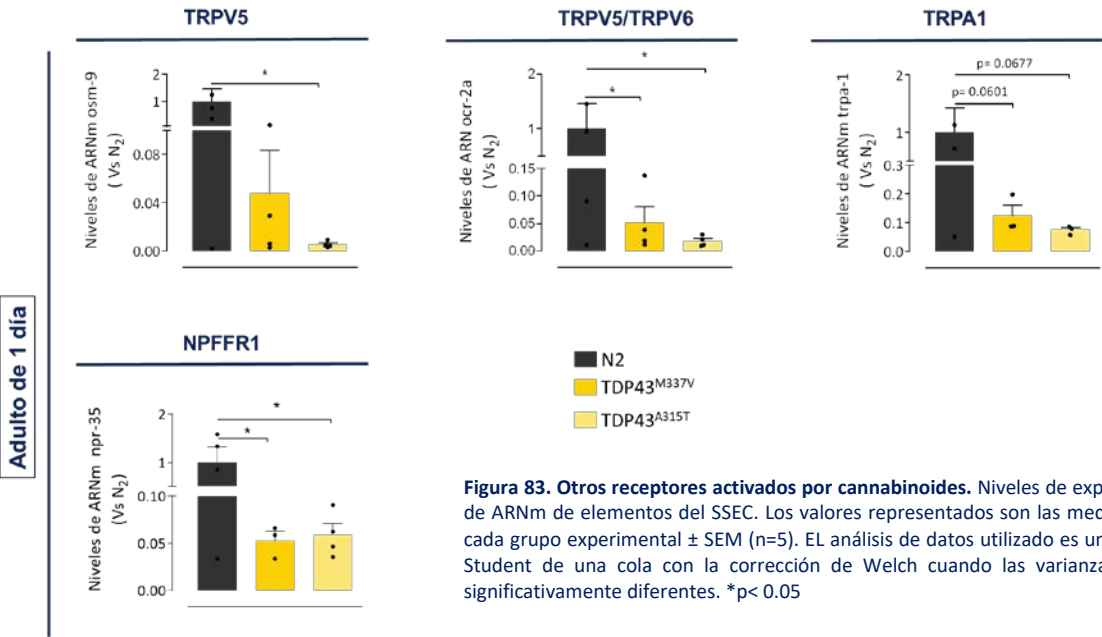
L2-L3, a excepción del receptor NPR-19 en los animales TDP43<sup>A315T</sup>, que ya muestra una reducción significativa en esa etapa de desarrollo, previa a la aparición de los déficits motores (Tabla 19).

Otros receptores relacionados con el SSEC

Asimismo, analizamos otros receptores relacionados con el SSEC sobre los que los ligandos ECs pudieran ejercer algún efecto (Figura 83). En este caso analizamos varios ortólogos de receptores TRPs y el receptor de neuropéptidos NPR-35. De nuevo, encontramos una marcada desregulación en los niveles de expresión de los receptores analizados en la etapa de desarrollo de adulto de un día. Por otro lado, los niveles de expresión de ARNm de los animales transgénicos para TDP43 en el estadio larvario L2-L3 previo a la aparición de síntomas motores no mostraron diferencias con respecto a los animales control (Tabla 20).

| Osm-9 (ortólogo de TRPV5)    |                |         |         |
|------------------------------|----------------|---------|---------|
| Grupos                       |                | P valor | Resumen |
| N2                           | TDP-43 (M337V) | 0,2231  | ns      |
| N2                           | TDP-43 (A315T) | 0,1737  | ns      |
| Ocr-2a (ortólogo de TRPV5/6) |                |         |         |
| Grupos                       |                | P valor | Resumen |
| N2                           | TDP-43 (M337V) | 0,1675  | ns      |
| N2                           | TDP-43 (A315T) | 0,4463  | ns      |
| Trpa-1 (Ortólogo de TRPA1)   |                |         |         |
| Grupos                       |                | P valor | Resumen |
| N2                           | TDP-43 (M337V) | 0,0853  | ns      |
| N2                           | TDP-43 (A315T) | 0,0755  | ns      |
| Npr-35 (ortólogo de NPFFR1)  |                |         |         |
| Grupos                       |                | P valor | Resumen |
| N2                           | TDP-43 (M337V) | 0,4127  | ns      |
| N2                           | TDP-43 (A315T) | 0,2165  | ns      |

Tabla 20. Evaluación de los niveles de otros receptores celulares relacionados con el SSEC en el nemátodo C. elegans en la etapa de desarrollo larva L2-L3. Datos analizados mediante una t de Student de una cola con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes



Enzimas implicadas en el metabolismo de los ligandos endógenos del SEC

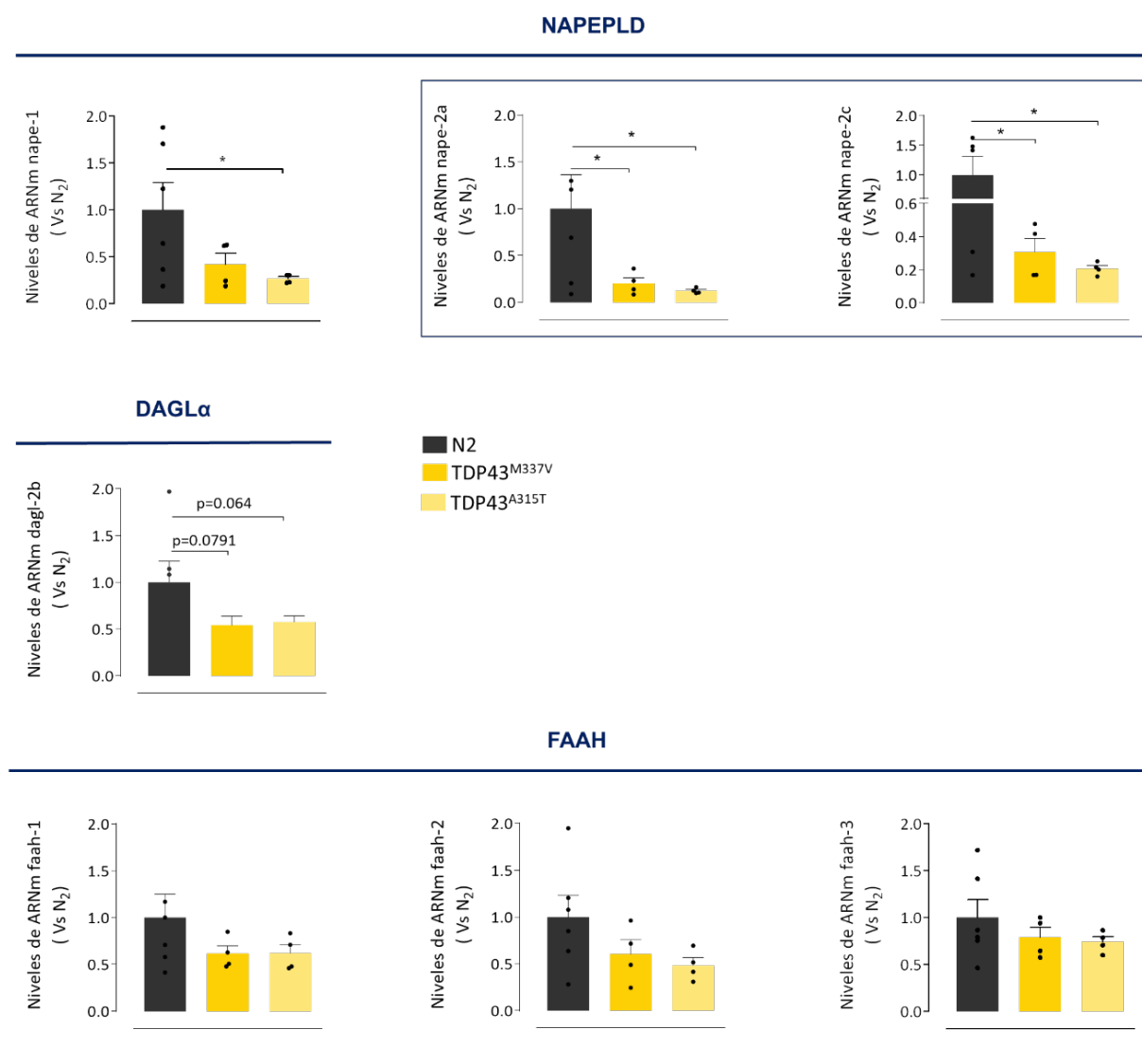
A continuación, analizamos los niveles de las principales enzimas de síntesis y degradación de los ECs presentes en este nemátodo, tanto en el estadio larvario L2-L3 como en la etapa adulta.

En el estadio larvario L2-L3 no encontramos diferencias significativas con respecto a los animales de la cepa N2 en ninguna de las enzimas responsables de la síntesis y degradación de los ECs en los nemátodos (Tabla 21). Sin embargo, en la etapa adulta, observamos una desregulación parcial de los sistemas de síntesis de ECs, con una marcada disminución de los niveles de expresión de las enzimas de síntesis de AEA NAPE-1 y NAPE-2. Los animales TDP43<sup>A315T</sup> mostraron diferencias estadísticamente significativas frente a la cepa N2 en los niveles de expresión de ambas enzimas, mientras que en el caso de la cepa transgénica TDP43<sup>M337V</sup>, solo encontramos diferencias estadísticamente significativas en el caso de la enzima NAPE-2. Por otro lado, no encontramos diferencias en los niveles de expresión de ARNm de *dagl-2b*, ortólogo de la DAGL $\alpha$  humana, aunque sí observamos cierta reducción en los niveles en ambos modelos experimentales. En el caso de las enzimas de degradación analizadas, no observamos diferencias en los niveles de expresión con respecto a los animales N2 a ninguna edad analizada (Figura 84).

En resumen, hemos observado que en estos dos modelos experimentales de ELA basados en la inserción de dos mutaciones de TDP43 (M337V y A315T) existe una alteración en etapas adultas tanto de los receptores activados por ECs como de sus enzimas de síntesis, alteraciones no encontradas en los estadios larvarios analizados, que se corresponden a etapas presintomáticas en estos animales. Debido a que estos elementos son ortólogos de los principales elementos del SEC en humanos, podemos relacionar estas alteraciones con una alteración de lo que hemos denominado SSEC.

| Nape-1  |                |         |         |
|---------|----------------|---------|---------|
| Grupos  |                | P valor | Resumen |
| N2      | TDP-43 (M337V) | 0,0975  | ns      |
| N2      | TDP-43 (A315T) | 0,1043  | ns      |
| Nape-2a |                |         |         |
| Grupos  |                | P valor | Resumen |
| N2      | TDP-43 (M337V) | 0,2237  | ns      |
| N2      | TDP-43 (A315T) | 0,3912  | ns      |
| Nape-2c |                |         |         |
| Grupos  |                | P valor | Resumen |
| N2      | TDP-43 (M337V) | 0,2054  | ns      |
| N2      | TDP-43 (A315T) | 0,4840  | ns      |
| Dagl-2b |                |         |         |
| Grupos  |                | P valor | Resumen |
| N2      | TDP-43 (M337V) | 0,3158  | ns      |
| N2      | TDP-43 (A315T) | 0,3773  | ns      |
| Faah-1  |                |         |         |
| Grupos  |                | P valor | Resumen |
| N2      | TDP-43 (M337V) | 0,4092  | ns      |
| N2      | TDP-43 (A315T) | 0,2619  | ns      |
| Faah-2  |                |         |         |
| Grupos  |                | P valor | Resumen |
| N2      | TDP-43 (M337V) | 0,3572  | ns      |
| N2      | TDP-43 (A315T) | 0,2951  | ns      |
| Faah-3  |                |         |         |
| Grupos  |                | P valor | Resumen |
| N2      | TDP-43 (M337V) | 0,2420  | ns      |
| N2      | TDP-43 (A315T) | 0,1201  | ns      |

**Tabla 21 Análisis de la maquinaria metabólica del SEC en etapas de desarrollo larva L2-L3.** Datos analizados mediante una t de Student de una cola con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes (n=4-5)



**Figura 84. Análisis de los niveles de expresión de los principales elementos relacionados con la maquinaria metabólica del SSEC en estadio adulto.** Niveles de expresión de ARNm de elementos SSEC. Los valores representados son las medias de cada grupo experimental  $\pm$  SEM (n=5). EL análisis de datos utilizado es una t de Student de una cola con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \*p< 0.05

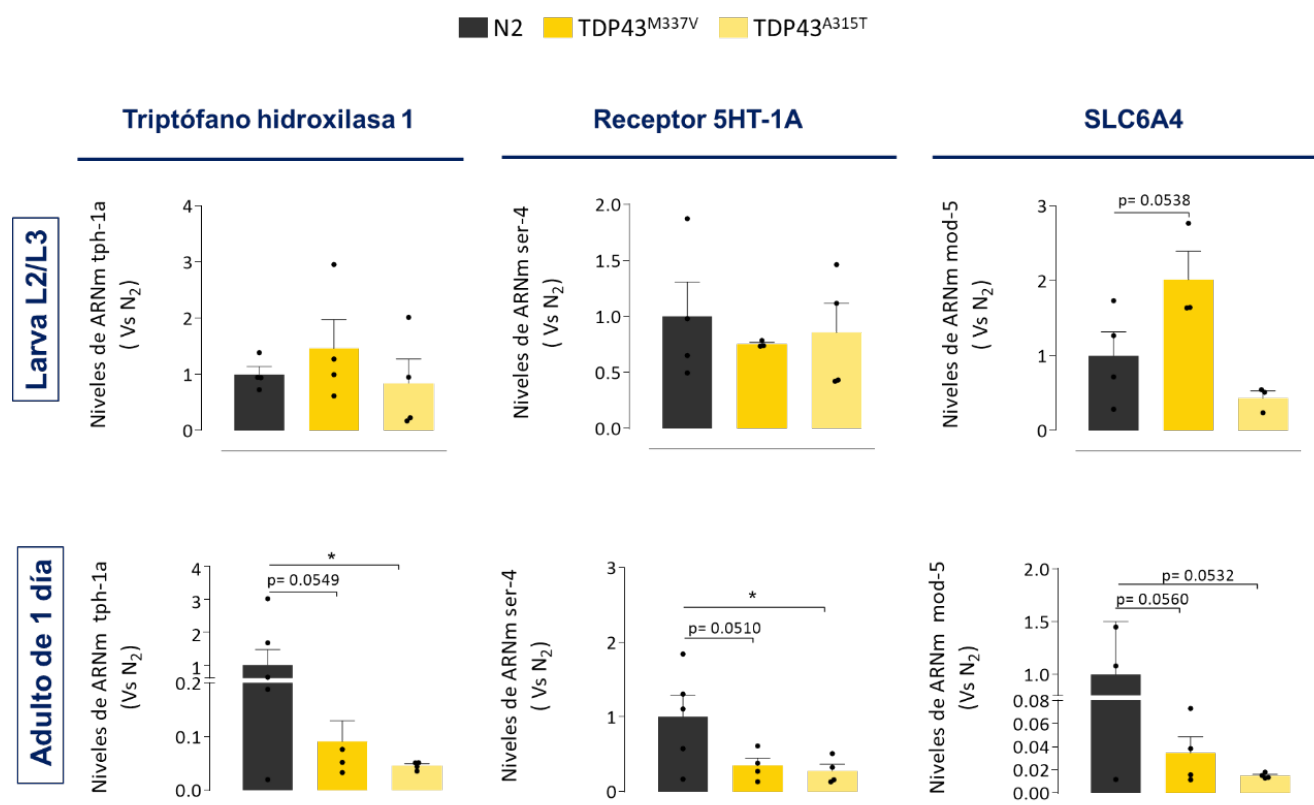
### 3. Estudio del sistema serotoninérgico

Por último, llevamos a cabo la caracterización del sistema serotoninérgico en los dos modelos experimentales de ELA. El sistema serotoninérgico se ha visto afectado tanto en pacientes como en otros modelos experimentales de ELA y en los nemátodos se encuentra muy implicado en la regulación de la locomoción. Por ello, quisimos evaluar brevemente el estado molecular de diferentes elementos de este Sistema en los dos modelos experimentales de ELA en los que analizamos el SSEC.

En este caso, llevamos a cabo el análisis de la maquinaria de síntesis de serotonina, la proteína TPH-1A, ortólogo de la triptófano hidroxilasa 1 humana, y de la recaptura de serotonina, el transportador MOD-5, ortólogo del canal SLC6A4 humano, así como los niveles de expresión del receptor SER-4, ortólogo del receptor humano 5-HT<sub>1A</sub>. Como podemos observar en la [Figura 85](#), los nemátodos con la inserción de la proteína TDP43 mutada presentaron una desregulación de los elementos del sistema serotoninérgico en la etapa adulta, etapa en la que se observan defectos marcados en la



locomoción. Así, observamos una disminución en los niveles de expresión de ARNm tanto de enzima de síntesis de serotonina, *tph-1*, el receptor de serotonina *ser-4* y el transportador de recaptura *mod-4*. En el periodo de desarrollo correspondiente a la etapa larvaria L2-L3, estos animales no presentaron ninguna alteración significativa de los niveles de expresión de los marcadores analizados. Sin embargo, en el caso de los animales TDP43<sup>M337V</sup> pudimos observar un ligero incremento en la expresión de ARNm de *mod-5*, transportador de recaptura de serotonina. De manera contraria, los animales TDP43<sup>A315T</sup> mostraron una tendencia a la reducción de este transportador de serotonina. Estos resultados nos podrían indicar una desregulación temprana del sistema serotoninérgico en estos animales como consecuencia de la presencia de ambas mutaciones en TDP43.

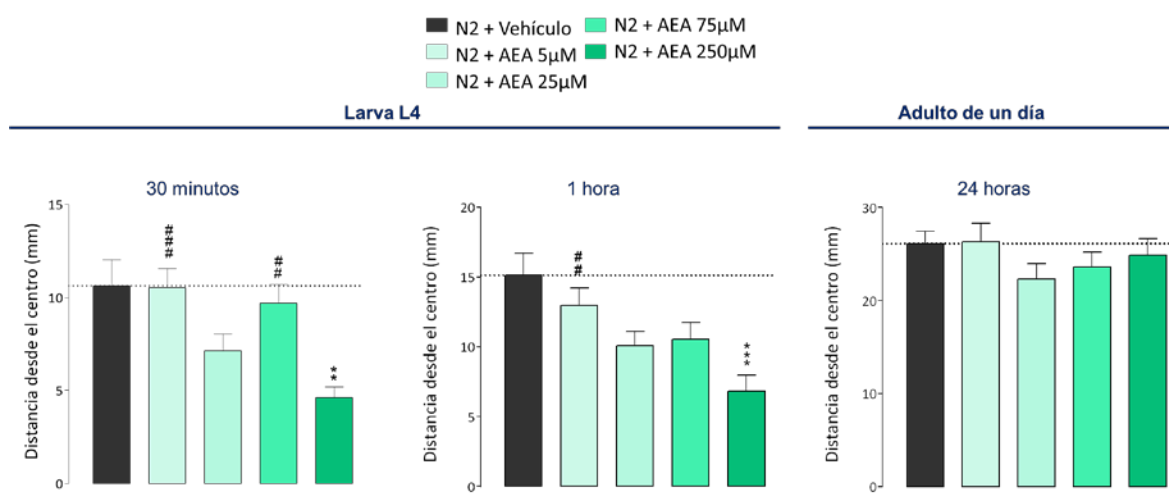


**Figura 85. Análisis de los elementos del sistema serotoninérgico.** Niveles de expresión de ARNm de elementos de regulación de la sinapsis serotoninérgica. Los valores representados son las medias de cada grupo experimental  $\pm$  SEM (n=4-5). EL análisis de datos utilizado es una t de Student de una cola con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \*p< 0.05

#### 4. Tratamiento farmacológico con AEA

En la última aproximación experimental desarrollada durante mi estancia breve en la Universidad de Washington, Seattle, también realizamos un estudio farmacológico con uno de los ligandos endocannabinoide, la AEA, con el fin de estudiar el efecto de este endocannabinoide en el fenotipo locomotor en ambos modelos experimentales de ELA. Para evaluar el efecto de la AEA, primero llevamos a cabo un estudio concentración-dependiente con la prueba comportamental de locomoción radial en tres etapas temporales en los animales N2 que se han utilizado en todo este diseño como controles (30 minutos, 1 hora y 24 horas) (Figura 86).

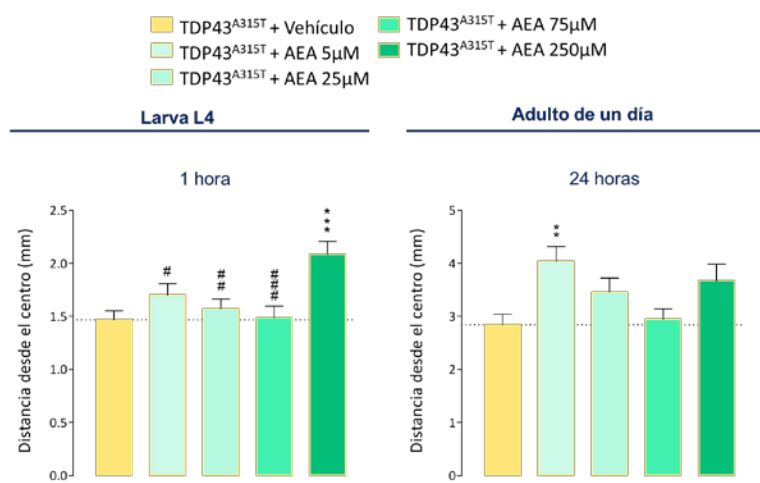
En el caso de los animales N2, dosis altas de AEA tuvieron un efecto en la actividad locomotora, reduciendo la distancia recorrida tanto a los 30 minutos como una hora después de iniciar la prueba, en concordancia con el clásico efecto que este endocannabinoide ejerce sobre el control motor en mamíferos. Sin embargo, tras 24 horas de prueba, los animales no mostraron diferencia en su actividad locomotora con respecto a los animales tratados con vehículo, algo que podría relacionarse con la pérdida progresiva de acción del fármaco con el tiempo.



**Figura 86. Efecto en la locomoción del tratamiento con AEA en los animales N2.** Se representa la media  $\pm$ SEM. (n= 30-46). La significancia estadística se determinó usando (A)(B) el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparación múltiple Dunn's \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001. (\* vs TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo # vs TDP43<sup>A315T</sup>+250 µM (C) ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple Newman-Keuls.

Por otro lado, para evaluar si este tratamiento pudiera tener cierto valor terapéutico, llevamos a cabo la prueba comportamental de locomoción radial a dos etapas temporales (1 hora y 24 horas) en los nemátodos transgénicos TDP43<sup>A315T</sup> y TDP43<sup>M337V</sup>.

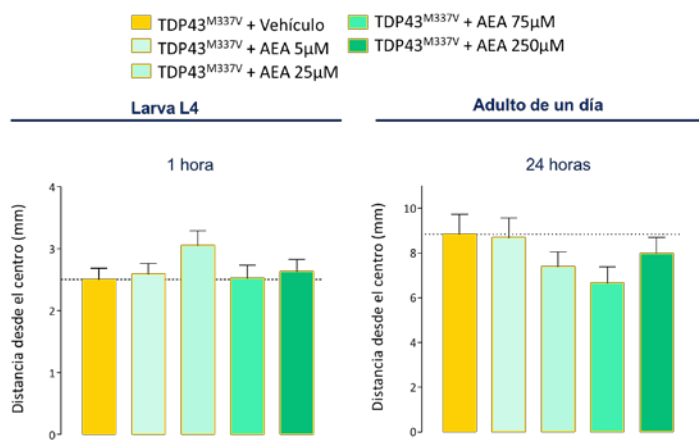
En el caso de los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con AEA (Figura 87), pudimos observar un efecto agudo en el caso de la dosis más alta de AEA, con un incremento significativo en la distancia recorrida con respecto a los animales tratados con



**Figura 87. Efecto en la locomoción del tratamiento con AEA en los animales TDP43<sup>A315T</sup>.** Los resultados muestran datos combinados de múltiples experimentos. Se representa la media  $\pm$ SEM. (n= 104-112). La significancia estadística se determinó usando el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparación múltiple Dunn's \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001. (\* vs TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo # vs TDP43<sup>A315T</sup>+250 µM

vehículo. Además, tras 24 horas de prueba y por tanto en ausencia del tratamiento, la dosis de 5 $\mu$ M mostró un efecto beneficioso incrementando significativamente la distancia recorrida con respecto a los animales tratados con vehículo.

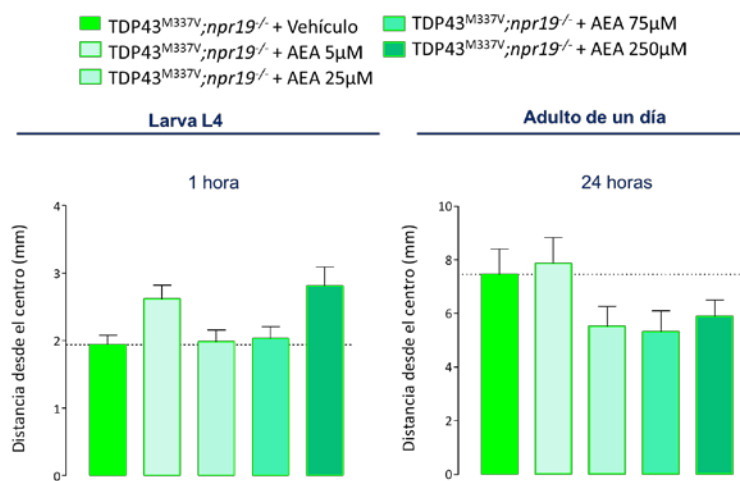
En el caso de los animales TDP43<sup>M337V</sup>, no observamos ningún efecto del tratamiento con las diferentes dosis de AEA sobre la locomoción de estos animales (Figura 88).



**Figura 88. Efecto en la locomoción del tratamiento con AEA en los animales TDP43<sup>M337V</sup>.** Los resultados muestran datos combinados de múltiples experimentos. Se representa la media  $\pm$  SEM. (n= 104-112). La significancia estadística se determinó usando el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparación múltiple Dunn's \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001. (\* vs TDP43<sup>A315T</sup>+vehículo # vs TDP43<sup>A315T</sup>+250  $\mu$ M

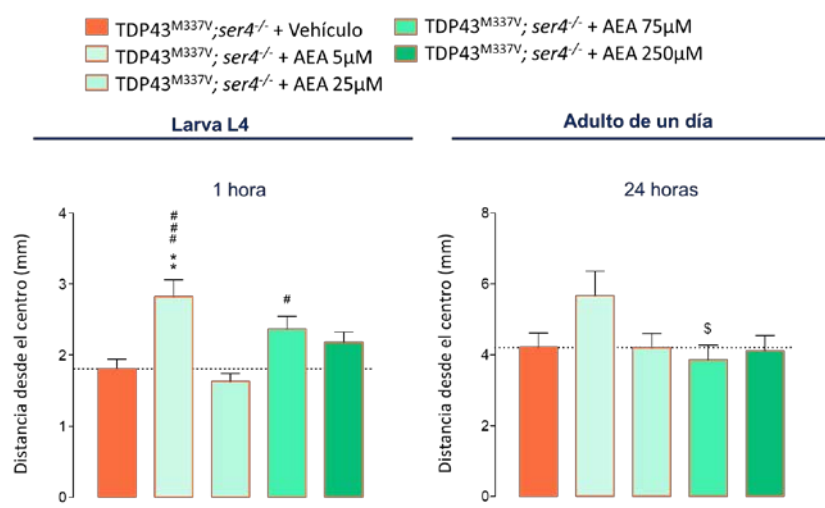
Debido a que está descrito que la AEA, además de activar los receptores NPR-19 (ortólogo de los receptores CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> en humanos) modula también los receptores SER-4 (ortólogo del receptor 5-HT<sub>1A</sub> humano), de manera complementaria quisimos evaluar si la modificación genética de estos animales podría modificar los resultados obtenidos en el modelo de TDP43<sup>M337V</sup>. Para ello, generamos dos cepas de dobles mutantes de nemátodo que presentaban la inserción de TDP43<sup>M337V</sup> y carecían o bien del receptor SER4 o bien del receptor NPR19.

Tras una hora de prueba, los animales dobles mutantes TDP43<sup>M337V</sup>;npr-19<sup>-/-</sup> a los que se administró AEA a 5 y 250  $\mu$ M mostraron una tendencia a la mejoría en la prueba de locomoción radial, sin llegar a mostrar diferencias estadísticamente significativas. Esta tendencia se perdió tras 24 horas de prueba de locomoción radial, momento en el que observamos una tendencia de hipolocomoción a las dosis más altas en estos animales (Figura 89).



**Figura 89. Efecto en la locomoción del tratamiento con AEA en los animales TDP43<sup>M337V</sup>;npr19<sup>-/-</sup>.** Los resultados muestran datos combinados de múltiples experimentos. Se representa la media  $\pm$ SEM. (n= 58-65). La significancia estadística se determinó usando el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparación múltiple Dunn's

Por otro lado, en el caso de los animales dobles mutantes TDP43<sup>M337V</sup>;ser4<sup>-/-</sup>, la administración de AEA mostró efectos beneficiosos tras 1 hora de prueba a las concentraciones de 5 y 75 μM. Tras 24 horas de test de locomoción, se mantuvo la tendencia solo en el caso de la dosis de 5 μM, aunque estas diferencias observadas con respecto al grupo control no eran estadísticamente significativas (Figura 90). Por lo tanto, tras la delección del receptor SER-4 en los nemátodos TDP43<sup>M337V</sup> observamos un efecto del tratamiento farmacológico con AEA incrementando la movilidad de estos animales, observándose diferencias significativas con respecto a los animales tratados con vehículo a la concentración de AEA 5μM, que se mantuvo parcialmente en el tiempo.



**Figura 90. Efecto en la locomoción del tratamiento con AEA en los animales TDP43<sup>M337V</sup>;ser4<sup>-/-</sup>.** Los resultados muestran datos combinados de múltiples experimentos. Se representa la media  $\pm$ SEM. (n=58-65). La significancia estadística se determinó usando el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparación múltiple Dunn's. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. (\* vs TDP43<sup>M337V</sup>;npr19<sup>-/-</sup>+vehículo # vs TDP43<sup>M337V</sup>;npr19<sup>-/-</sup>+25 μM; \$ vs TDP43<sup>M337V</sup>;npr19<sup>-/-</sup>+5 μM)





# DISCUSIÓN

---





La ELA es una END desoladora, en la cual el 90% de los pacientes fallecen entre los 3-5 años posteriores al diagnóstico clínico<sup>545</sup>. En el transcurso de esta patología se produce una degeneración progresiva de las MNs superiores de la corteza motora y los tractos corticoespinales, así como de las MNs inferiores del tronco encefálico y la médula espinal. Como consecuencia de ello, existe una pérdida de comunicación entre el músculo y la MN, causando debilidad muscular, espasticidad, atrofia y parálisis de las extremidades, y en último término fallo respiratorio letal. A pesar de que la ELA es la tercera END en cuanto a su incidencia, actualmente existe una llamativa falta de tratamientos efectivos para prevenir, retrasar o frenar la muerte neuronal en los pacientes<sup>5</sup>. Por este motivo, hay una imperante necesidad de buscar nuevas estrategias farmacológicas que consigan enlentecer o incluso frenar la progresión de esta enfermedad, proporcionando una mejora significativa de la calidad de vida de las personas diagnosticadas con ELA.

La modulación del SEC es capaz de desencadenar una serie de respuestas que modifican los mecanismos activados tras el daño celular, incidiendo en eventos como el estrés oxidativo, la neuroinflamación o la excitotoxicidad<sup>440,449,546</sup>. Además, numerosas investigaciones han descrito alteraciones en el SEC durante el transcurso de diversas patologías, incluidas enfermedades como el Alzheimer, la enfermedad de Huntington o la Esclerosis Múltiple, motivo por el cual se ha establecido un papel beneficioso en la modulación del SEC como estrategia terapéutica en estas END<sup>448,547-549</sup>.

En este sentido, por sus múltiples propiedades protectoras, los derivados cannabinoides están adquiriendo cada vez más presencia en el ámbito clínico para el tratamiento sintomático y neuroprotector de diversas END, incluyendo la ELA<sup>432,448,550,551</sup>. Con esta Tesis Doctoral hemos querido contribuir al avance de este objetivo de desarrollar fármacos cannabinoides con potencial neuroprotector para la ELA, centrándonos en cuatro aspectos principales. Primero, demostrar el potencial del receptor CB<sub>2</sub> en la ELA. Además, hemos querido añadir otras posibles dianas farmacológicas con potencial en la ELA (receptores PPAR, GPR55, etc.) investigando con fitocannabinoides atípicos. En tercer lugar, hemos querido optimizar un tratamiento neuroprotector para la ELA basado en uno de estos derivados botánicos cannabinoides, el CBDA. Por último, hemos tratado de validar el interés de los modelos del ELA en invertebrados como el nemátodo *C. elegans* para el estudio y cribado de nuevas terapias basadas en cannabinoides en la ELA.

### **Estudio del papel del receptor CB<sub>2</sub> en las causas y mecanismos de la ELA. Implicación terapéutica de su modulación farmacológica.**

En la ELA, al igual que en otras END, existe una alteración en ciertos elementos del SEC durante la progresión de la enfermedad. Concretamente, se ha descrito la sobreexpresión en el receptor CB<sub>2</sub>, una de las respuestas endógenas más descritas en otras END<sup>185,460,512</sup>. Este incremento en la expresión de este receptor se interpreta como parte de un mecanismo endógeno de respuesta a los fenómenos de daño y/o estrés celular que se desencadenan durante ciertos procesos neurodegenerativos, como la neuroinflamación<sup>466</sup>. Se ha encontrado un incremento en los niveles de CB<sub>2</sub> tanto en muestras *post mortem* de pacientes como en diferentes modelos experimentales de ELA<sup>89,126,184,494</sup>. En concreto, nuestro grupo de investigación llevó a cabo por primera vez la caracterización del SEC en el modelo experimental de ELA basado en la mutación TDP43<sup>A315T</sup> utilizado en esta Tesis Doctoral, observando niveles elevados del receptor CB<sub>2</sub> en la médula espinal, tanto en etapas tempranas sintomáticas como en las de sintomatología avanzada<sup>184</sup>.

Considerando estas evidencias, en la primera parte del desarrollo de esta Tesis Doctoral se quiso comprobar si, al igual que en otras END, la sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub> en el modelo murino de ELA de TDP43<sup>A315T</sup> responde a un mecanismo neuroprotector endógeno frente al daño celular sobrevenido. Para ello, el objetivo principal del Diseño Experimental 1 ha sido investigar la implicación del receptor CB<sub>2</sub> en la fisiopatología de la ELA mediante diversas estrategias, tanto farmacológicas como mediante modificaciones genéticas. Para llevar a cabo este objetivo, en primer lugar, comprobamos el potencial neuroprotector del receptor CB<sub>2</sub> mediante su activación con el potente agonista selectivo HU308. Seleccionamos este agonista en base a estudios previos realizados en nuestro laboratorio en diferentes modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas, así como en base a criterios farmacológicos que nos mostraron este compuesto como una herramienta experimental muy adecuada para este estudio, por su selectividad, eficacia y baja toxicidad<sup>552</sup>.

Este modelo experimental de ELA basado en la inserción de TDP43<sup>A315T</sup> presenta signos de disfunción muscular desde la fase sintomática temprana, evaluada utilizando como marcador el reflejo de claspings de las extremidades posteriores. Este reflejo es un marcador de progresión patológica ampliamente utilizado en modelos experimentales para el estudio de la ELA, y se relaciona con la distonía y espasticidad, dándonos una idea de la severidad de la disfunción motora<sup>553,554</sup>. En los pacientes con ELA, la espasticidad es uno de los síntomas más recurrentes. Por este motivo, los esfuerzos terapéuticos basados en cannabinoides se han centrado en la búsqueda de nuevos tratamientos para atajar esta sintomatología. De este modo, se han llevado a cabo varios ensayos clínicos para evaluar el efecto de formulaciones basadas en cannabinoides ( $\Delta^9$ -THC: CBD en combinación equimolar) en el tratamiento de la espasticidad en esta y otras EMN, mostrando resultados satisfactorios tanto por la efectividad como por el perfil de bioseguridad que presentan<sup>487,511</sup>. En el modelo experimental de TDP43<sup>A315T</sup>, tras la activación del receptor CB<sub>2</sub> mediante la administración del agonista selectivo HU308, mejoró la espasticidad y la distonía de los ratones transgénicos TDP43<sup>A315T</sup>, ya que retrasó una semana la aparición de este reflejo en los animales. Ciertos trabajos han relacionado los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> con el control de la espasticidad en modelos experimentales de END, como la Esclerosis Múltiple<sup>555</sup>, una enfermedad donde el componente inflamatorio es muy importante. En efecto, se ha observado que la inflamación crónica juega un papel crucial en la aparición de la espasticidad, por medio de la acción de las citoquinas liberadas por las células del sistema inmune, que ejercen un efecto directo sobre el control y la regulación de las vías excitatorias<sup>556</sup>. En la ELA, uno de los eventos patológicos más relevantes es la neuroinflamación, descrita tanto en pacientes como en modelos experimentales murinos. Concretamente, en nuestro modelo experimental de TDP43<sup>A315T</sup> existe un componente inflamatorio muy marcado. Además, ha descrito la activación del receptor CB<sub>2</sub> como mecanismo protector frente a los procesos inflamatorios<sup>465</sup>. Teniendo en cuenta todo esto, el retraso en la aparición de la espasticidad observado tras el tratamiento con el agonista HU308 parece estar relacionado con una reducción del ambiente inflamatorio crónico en el que se encuentran las MNs. Se ha demostrado que el receptor CB<sub>2</sub> tiene un papel relevante modulando estado de activación de las células de microglía<sup>557,558</sup>, y en el caso de los animales transgénicos TDP43<sup>A315T</sup>, observamos una reducción de la activación de las células de microglía asociada al tratamiento crónico con este agonista selectivo. Sin embargo, a nivel motor, este tratamiento no consiguió mejorar la funcionalidad motora de los animales. Ensayos llevados a cabo en otro modelo experimental de ELA basado en la inserción de la mutación SOD1<sup>G93A</sup> sí que mostraron que, tanto tras la estimulación selectiva del receptor CB<sub>2</sub>, como mediante la ablación genética de las enzimas de degradación de ECs, se producía una mejora funcional, retrasando la disfunción motora en torno a 12

días en comparación con los animales transgénicos tratados con vehículo. En este caso el tratamiento farmacológico utilizado fue el agonista selectivo CB<sub>2</sub> AM1241<sup>433,461,491</sup>. Estas discrepancias se pueden atribuir a diferentes factores. Primero, ambos modelos experimentales muestran diferencias en cuanto al debut y la progresión de la enfermedad. El modelo basado en la mutación SOD1<sup>G93A</sup> es un modelo progresivo, en el que la ventana sintomática establecida varía entre 70-90 días, en comparación con el modelo de TDP43<sup>A315T</sup> con el que trabajamos, en el que la ventana sintomática entre síntomas leves y muy severos está establecida entre 25-35 días<sup>184,525</sup>. En este sentido, podemos achacar nuestra falta de efecto a nivel funcional a las diferencias observadas en la severidad del modelo, ya que en el modelo de TDP43<sup>A315T</sup> la neurodegeneración se desencadena a mayor velocidad. Por otro lado, el protocolo experimental para evaluar la funcionalidad motora utilizado en ambos casos es ligeramente diferente. En el caso de los animales transgénicos SOD1<sup>G93A</sup>, realizan una prueba de Rotarod a velocidad constante durante un periodo de tiempo determinado, de modo que se evalúan la fatiga y debilidad muscular en estos animales. En nuestro caso, al tratarse de una prueba de Rotarod en aceleración, estamos evaluando adicionalmente la coordinación y fuerza motora de estos animales. Por lo tanto, la prueba en aceleración es más completa, pero probablemente menos sensible a pequeñas diferencias. En cualquier caso, al margen de la falta de mejoría en la prueba de Rotarod, los resultados obtenidos en los análisis histológicos de las poblaciones neuronales corroboran los efectos beneficiosos que encontramos en la evaluación funcional de los animales transgénicos tras el tratamiento con HU308 (mediante la evaluación del reflejo de claspings), ya que observamos que la administración del agonista CB<sub>2</sub> ejerció un efecto neuroprotector, manteniendo las poblaciones de MNs de la médula espinal a los niveles de los animales sanos. Este efecto nos confirma que la activación del receptor CB<sub>2</sub> en los ratones TDP43<sup>A315T</sup> ejerce una función protectora mitigando la neurodegeneración y con ello retrasando el progreso de la enfermedad en los animales, efecto observado anteriormente en otros modelos experimentales<sup>433,461,491</sup>. No obstante, a pesar de los excelentes resultados preservando la supervivencia neuronal hasta estadios avanzados de la enfermedad, estas MNs parecen llegar a las etapas finales del tratamiento con ciertos defectos funcionales, ya que a tiempo final no se observó ningún efecto beneficioso en cuanto a la funcionalidad motora en estos animales. Este resultado podría indicarnos que la MN no están innervando correctamente la fibra muscular. El desmantelamiento de la sinapsis en la UNM es uno de los eventos patogénico primarios descritos en la ELA<sup>559-561</sup>, y dado que el análisis de viabilidad neuronal lo llevamos a cabo mediante la tinción de Nissl de los cuerpos neuronales, cabe la posibilidad de que el tratamiento farmacológico con HU308 produzca una demora en la pérdida completa de las MNs pero que estas células hayan comenzado a degenerar, por lo que su funcionalidad ya se haya visto afectada. Las motoneuronas son células tremendamente sensibles a los eventos fisiopatológicos por diversas razones y una de las más importantes es la gran longitud de sus axones<sup>562</sup>. Podría estar sucediendo que la activación crónica del receptor CB<sub>2</sub> ejerza un efecto antiinflamatorio que mejore la homeostasis de la MN y retrase su muerte, pero no consiga bloquear completamente las alteraciones funcionales que surgen como consecuencia de presencia de la proteína TDP43<sup>A315T</sup> en estos animales<sup>525</sup>. En cultivos primarios de MNs, se ha descrito una alteración en el crecimiento axonal como consecuencia de la sobreexpresión de la proteína TDP43 mutada<sup>563</sup>. Esta posible explicación iría en consonancia con resultados previos consultados en la bibliografía, en la que encontramos tratamientos farmacológicos muestran un efecto preservando las MNs pero, sin embargo, no ejercen beneficios sobre el fenotipo motor de los animales en otros modelos de ELA basados en TDP43<sup>A315T</sup><sup>564</sup>. Una posible solución a este respecto podría ser la optimización del tratamiento con cannabinoides específicos de CB<sub>2</sub> buscando sinergias con otros cannabinoides con perfiles complementarios (como se detallará más adelante), o bien con otros compuestos no-

cannabinoides pero con actividad sobre otro tipo de dianas o procesos, como la excitotoxicidad (por ejemplo, el agente glutamatérgico Riluzol).

Por otro lado, como hemos comentado anteriormente, la activación farmacológica del receptor CB<sub>2</sub> ejerce un efecto directo sobre los procesos de reactividad microglial que acompañan a la muerte neuronal en este modelo experimental. Los animales tratados con el compuesto HU308 mostraron una reducción en los niveles de microgliosis en la zona ventral de la médula espinal, en la zona contigua a las poblaciones neuronales. Además, realizando un análisis más exhaustivo de esta población celular, observamos que la microglía presente en los animales transgénicos tratados mostró unas características morfológicas muy diferentes a las que encontramos en la microglía de los animales TDP43<sup>A315T</sup> sin tratamiento farmacológico. Específicamente, las células de microglía de los animales transgénicos tratados con vehículo mostraron un incremento en el tamaño del soma celular, acompañado de un acortamiento de las prolongaciones celulares. En cambio, tras el tratamiento con HU308, se produjo una reducción en el tamaño del cuerpo celular y un aumento en la longitud de las ramificaciones, hasta niveles similares a los de los animales no transgénicos. La neuroinflamación es un evento primario en los pacientes con ELA, viéndose un aumento en la presencia de células de microglía y un alto grado de activación de estas células en tejidos afectados por la patología<sup>565–567</sup>. Además, se ha descrito un incremento en la expresión del receptor CB<sub>2</sub> en estas células<sup>89</sup>. Este proceso de reclutamiento de células de microglía activadas que además presentan sobreexpresado el receptor CB<sub>2</sub>, observado en muestras de pacientes, se reproduce en el modelo experimental de TDP43<sup>A315T</sup>, ya que los animales tratados con vehículo muestran un incremento significativo de la inmunorreactividad de IBA-1, y este marcador colocaliza con el inmunomarcaje del receptor CB<sub>2</sub><sup>184</sup>. El hecho de que tras una activación crónica del receptor CB<sub>2</sub> encontremos una microglía altamente ramificada, morfología tradicionalmente relacionada con microglía en estado de reposo o activada con un fenotipo antiinflamatorio<sup>557</sup>, corrobora el potencial antiinflamatorio que está ejerciendo el receptor CB<sub>2</sub> en esta enfermedad neurodegenerativa, a través de la modulación de la activación de las células de microglía<sup>455</sup>. Asimismo, los resultados de los análisis de niveles de expresión del receptor CB<sub>2</sub> en el modelo parecen indicar que el tratamiento con el compuesto HU308 incrementa aún más la expresión génica de este receptor, ya sobreexpresado en nuestro modelo experimental de ELA. Este incremento en la expresión del receptor CB<sub>2</sub> podría correlacionarse con los efectos inmunomoduladores del tratamiento con el agonista selectivo<sup>194</sup>.

Sin embargo, los resultados de los análisis moleculares de niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias IL6 y TNF $\alpha$  en la zona lumbar de la médula espinal no mostraron la reducción esperada. En vista de los resultados en el análisis histológico de la microglía, cabría esperar que un cambio morfológico de la microglía a estados ramificados fuera acompañado de un cambio en su fenotipo de activación y con ello una disminución en la liberación de factores proinflamatorios<sup>557,568</sup>. No obstante, debemos tener en cuenta que un incremento en los niveles de expresión no implica automáticamente un aumento en la expresión de proteínas, por lo que sería interesante llevar a cabo ensayos de ELISA para la detección de citoquinas liberadas. Además, las células de microglía no son las responsables exclusivas de la liberación de citoquinas proinflamatorias, y otros tipos celulares, como los astrocitos, también responden de este modo en condiciones patológicas, contribuyendo a la neuroinflamación<sup>52</sup>. En nuestros resultados, el tratamiento farmacológico con el agonista CB<sub>2</sub>, contrariamente a lo que ocurría en las células de microglía, no redujo los niveles de activación astrogial, a pesar de que también se ha descrito cierta presencia del receptor CB<sub>2</sub> en astrocitos en este modelo

experimental<sup>462</sup>. En ciertos modelos experimentales de enfermedad de Alzheimer se ha descrito que los receptores TRPA1 tienen un papel determinante modulando la reactividad astrocitaria<sup>569</sup>. Además, se ha descrito que la activación de los canales TRPA1 astrocitarios incrementan la actividad glutamatérgica espontánea<sup>570</sup>. Una de las características farmacológicas descritas para el compuesto HU308 es su capacidad de activar estos canales iónicos TRPA1, lo que podría explicar la falta de efecto en la reducción de la astrogliosis y el consecuente incremento observado en las citoquinas proinflamatorias IL6 y TNF $\alpha$ <sup>84,571</sup>. Además, estos resultados ponen de manifiesto la relevancia de la modulación de los receptores CB<sub>2</sub> particularmente localizados en las células de microglía. Por otro lado, se ha descrito en la ELA que la infiltración de macrófagos y otras células de la respuesta inmune periférica pueden tener un efecto perjudicial sobre el contexto inflamatorio que se desencadena en esta enfermedad<sup>572,573</sup>. Por lo tanto, los efectos beneficiosos de la activación del receptor CB<sub>2</sub> observados a nivel de la activación de las células de microglía podrían resultar insuficientes para mitigar otras respuestas proinflamatorias, que podrían estar contribuyendo en el aumento de expresión de citoquinas. Por lo tanto, estos resultados apoyan el hecho de que, bajo ciertas condiciones patológicas, como las que ocurren en la ELA, el receptor CB<sub>2</sub> se encuentra sobreexpresado como mecanismo compensatorio endógeno.

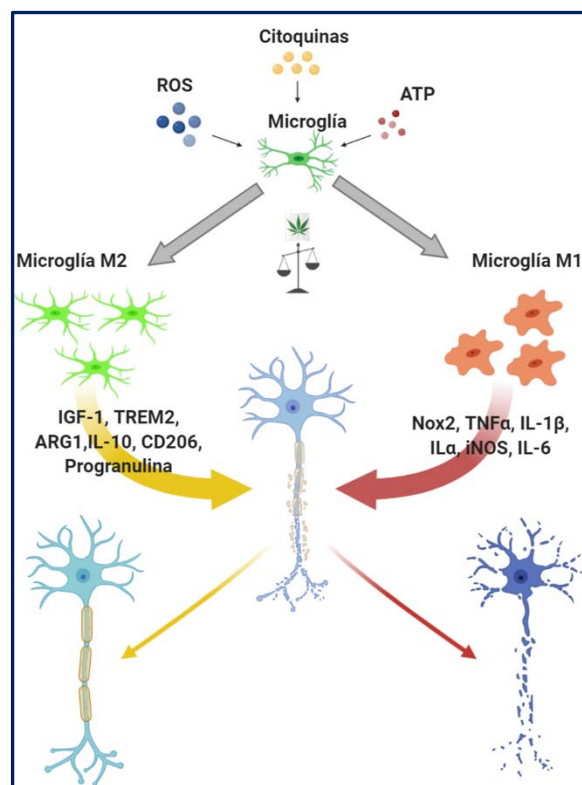
Los resultados de esta primera aproximación experimental parecen corroborar el gran beneficio que puede implicar el uso de terapias dirigidas hacia el SEC para hacer frente a la neuroinflamación en la ELA, concretamente dirigidas al receptor CB<sub>2</sub><sup>574</sup>. Por ende, cabría esperar que la inactivación o disfunción del receptor CB<sub>2</sub> en un contexto inflamatorio crónico, tuviera consecuencias sobre los procesos fisiopatológicos que desencadenan una neurodegeneración progresiva y finalmente la muerte de la MN. Para comprobar esta idea, llevamos a cabo la segunda aproximación experimental en este diseño experimental, llevada a cabo mediante dos enfoques: la administración de un antagonista CB<sub>2</sub>, con el fin estudiar la implicación del bloqueo farmacológico de este receptor desde las fases tempranamente sintomáticas de la enfermedad, y la delección genética completa del receptor CB<sub>2</sub> en el modelo experimental de ELA basado en la mutación TDP43<sup>A315T</sup>. Para el bloqueo farmacológico, seleccionamos el compuesto AM630, ya que por sus características farmacológicas y por su perfil de seguridad en los tratamientos experimentales es ampliamente utilizado<sup>463,575,576</sup>. Por otro lado, gracias a la generación del ratón doble mutante TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup> hemos podido emular un contexto patológico de tipo ELA en el que en ningún momento se desencadena la respuesta neuroprotectora que acompaña a la sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub>. Por lo tanto, de esta forma hemos evaluado la carencia funcional del receptor CB<sub>2</sub> en dos periodos temporales, bien durante todo el desarrollo de la enfermedad, o bien a partir del periodo sintomático.

Como hipotetizábamos anteriormente, el bloqueo funcional de CB<sub>2</sub>, tanto temporalmente, tras la estrategia farmacológica, como mediante la delección del receptor, tuvo consecuencias empeorando el fenotipo motor del modelo animal de TDP43<sup>A315T</sup>. Por un lado, los resultados comportamentales observados tras la delección del receptor CB<sub>2</sub> en este modelo experimental corroboran el papel neuroprotector que ejerce la activación endógena de este receptor en el transcurso de la patología. Los animales dobles mutantes TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup> mostraron un adelantamiento de 4 semanas en la aparición de los síntomas motores, en comparación con el modelo experimental de ELA basado en TDP43<sup>A315T</sup>. En consonancia con la disfunción motora temprana, estos animales doble-mutantes presentaron una pérdida notable de MNs espinales a los 65 días edad, mostrando diferencias significativas con respecto los animales TDP43<sup>A315T</sup>, que no mostraron diferencias con los animales no transgénicos utilizados como control. Este descenso en el número de neuronas se pudo observar tanto

mediante la tinción de Nissl como en los resultados obtenidos con el marcaje de ChAT. Este último inmunomarcaje mostró un descenso aún más acusado en las MNs positivas para este marcador colinérgico en los animales dobles mutantes, lo que de nuevo podría estar indicando que, como especulábamos en el tratamiento con HU308, las MNs contabilizadas mediante la tinción de Nissl parecen estar en un proceso de degeneración progresiva y no son completamente funcionales<sup>128,577</sup>. Sin embargo, sería necesario realizar pruebas adicionales para confirmarlo.

La disfunción motora temprana en los animales dobles mutantes vino acompañada de un incremento en la inmunorreactividad glial, lo que implica un reclutamiento de células de microglía y aumento de la proliferación de astrocitos en la médula espinal. Al igual que en este modelo experimental, el reclutamiento de células de glía activada en la zona adyacente a las MNs se ha observado en pacientes de la enfermedad, y podría ser responsable de los procesos neuroinflamatorios que presumiblemente participan en la muerte de las MNs. Además, no podemos olvidar que en los procesos de neurodegeneración, las propias neuronas participan activamente en la generación del contexto inflamatorio, liberando tras el daño neuronal moléculas proinflamatorias que activan y reclutan a nuevas células de glía<sup>578</sup>.

Curiosamente, a los 65 días de edad, encontramos un aumento en los niveles de expresión de citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  en los animales TDP43<sup>A315T</sup>. Se ha descrito en otros modelos genéticos de ELA una impronta temprana de las células de microglía hacia fenotipos proinflamatorios, con un perfil de expresión de citoquinas en estadios presintomáticos similar al observado en nuestros resultados en el modelo de TDP43<sup>A315T</sup><sup>579,580</sup>. De este modo, mientras que en los animales TDP43<sup>A315T</sup> no encontramos alteraciones funcionales ni activación glial acompañando al incremento de niveles de expresión de marcadores proinflamatorios a los 65 días de edad, en el modelo de dobles mutantes TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup> ya se observan alteraciones disfuncionales y procesos tanto neurodegenerativos como neuroinflamatorios en esta etapa. Este efecto puede ser debido a que la falta del receptor CB<sub>2</sub> impide la activación glial hacia fenotipos antiinflamatorios y neuroprotectores. Como ya comentamos anteriormente, desde etapas muy tempranas existe una alta activación de las células de glía tanto en pacientes como en otros modelos experimentales<sup>81,578,581,582</sup>. De hecho, se ha descrito en la ELA que el proceso neuroinflamatorio se produce en dos fases. En estadios iniciales de la patología, se desencadena una respuesta de la microglía hacia una activación alternativa, en la que las células de microglía aumentan su capacidad neuroprotectora. Sin embargo, con el avance de la enfermedad y el aumento de la señalización de estrés neuronal, se produce una transformación de estas células hacia un fenotipo proinflamatorio o M1, en el que cambian su perfil de liberación de citoquinas y quimioquinas, resultando citotóxicas para las MNs<sup>566,583-585</sup>. Por otro lado, se ha descrito que los ECs, mediante la activación de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, son capaces



**Figura 91. Mecanismo de neuroprotección compensatoria propuesto en el modelo de TDP43<sup>A315T</sup>. Adaptado de Filipi et al. 2020**

de dirigir o modular el fenotipo de activación de las células de microglía, hacía fenotipos de activación alternativa (M2b) o desactivación adquirida (M2c)<sup>203,466,557,568</sup>. Por lo tanto, en el caso de los animales TDP43<sup>A315T</sup>;Cnr2<sup>-/-</sup>, en los que no se produce una respuesta de sobreexpresión endógena de CB<sub>2</sub> compensatoria, nos encontramos unas células de microglía altamente activadas en un fenotipo proinflamatorio, lo que contribuye a generar un contexto temprano de inflamación, estrés oxidativo y excitotoxicidad en el que tanto los astrocitos como las MNs se ven gravemente afectadas<sup>203</sup>. Sin embargo, en los animales TDP43<sup>A315T</sup> la sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub> desencadena una respuesta compensatoria que bloquea inicialmente los procesos neurodegenerativos<sup>77,568,584,586</sup> (Figura 91).

Por otro lado, el bloqueo farmacológico crónico del receptor CB<sub>2</sub> con el antagonista AM630 desde periodos sintomáticos acelera la aparición de los defectos funcionales en nuestro modelo experimental. Además, estos animales presentan una aparición temprana de signos de disfunción muscular, evaluados por el reflejo de clasping, en comparación con los animales a los que se les administró vehículo, lo que ratifica la importancia de la activación receptor CB<sub>2</sub> en la aparición de la espasticidad.

A pesar de ello, a medida que avanzó la enfermedad, observamos que bloquear la activación del receptor CB<sub>2</sub> por ambas estrategias no agravó el deterioro locomotor de los animales, ni la evolución de los signos de espasticidad y distonía en el caso del tratamiento farmacológico con AM630, ya que los animales finalizaron el tratamiento farmacológico con niveles similares de disfunción motora a los animales TDP43<sup>A315T</sup>. De la misma manera, a los 90 días de edad, la ausencia funcional del receptor CB<sub>2</sub> no produjo un incremento en la neurodegeneración observada en el modelo de TDP43<sup>A315T</sup>, ni en los procesos de activación glial. Por lo tanto, estos resultados nos indican que la carencia del receptor CB<sub>2</sub> provoca un cambio en el momento en el que aparecen los síntomas clínicos, pero no un agravamiento de la tasa del deterioro motor.

Por otro lado, sí observamos un efecto directo de la delección del receptor CB<sub>2</sub> sobre la longevidad de los animales TDP43<sup>A315T</sup>, reduciendo significativamente la supervivencia de los ratones. Por lo tanto, debido a que estos animales no presentan un agravamiento en el tiempo de los síntomas, nos encontramos con que la ausencia del receptor CB<sub>2</sub> conduce a que esta enfermedad se vea adelantada en el tiempo.

El hecho de que el bloqueo farmacológico de CB<sub>2</sub> en el periodo sintomático no tenga un efecto perjudicial notable a nivel de la neuroinflamación, impidiendo los mecanismos endógenos protectores que se desencadenan contra la activación de las células de microglía, puede deberse a diferentes razones. Por un lado, el bloqueo farmacológico de una diana tiene limitaciones. Puesto que los compuestos tienen unas características farmacocinéticas determinadas, el efecto que producen responde a un pico de concentración del compuesto en sangre, que va disminuyendo con el transcurso de las horas. Por este motivo, podríamos pensar mediante el tratamiento farmacológico con el antagonista AM630, si bien reducimos el tono endógeno general de activación del receptor, no conseguimos bloquear su actividad permanentemente. Sin embargo, los resultados obtenidos con el modelo genético de dobles mutantes nos hacen desechar, al menos parcialmente, esta hipótesis de falta de efecto. Estos resultados nos indican que el papel neuroprotector que ejerce este receptor en nuestro modelo experimental de ELA deja de ser determinante llegados ciertos estadios de la patología, cuando los mecanismos neurodegenerativos se agravan irremediabilmente. Por lo tanto, una vez alcanzada la fase sintomática, cuando los diferentes eventos fisiopatológicos, como por ejemplo la inflamación, ya han producido

alteraciones considerables, el bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> no implica grandes cambios en el avance de los procesos neuropatológicos que están dándose lugar.

En resumen, teniendo en cuenta todos los resultados de este primer Diseño Experimental, podemos concluir que tanto la activación farmacológica como el incremento de expresión del receptor CB<sub>2</sub> de manera endógena sirven como mecanismos protectores frente a la neuroinflamación que sucede en el modelo experimental de ELA. Además, hemos podido establecer una ventana temporal en la que la activación del receptor CB<sub>2</sub> alcanza su máxima relevancia como mecanismo neuroprotector en estos animales. De manera similar a los resultados en nuestro modelo experimental, otros modelos experimentales de daño agudo en el SNC han descrito una ventana terapéutica en la que la activación del receptor CB<sub>2</sub> es efectiva frente a la neurodegeneración<sup>587</sup>. Este resultado es consistente con lo descrito en la bibliografía, en la que se establece una ventana funcional en las células de microglía, en la cual estas células son más susceptibles a la modulación por parte de los ECS<sup>203</sup>. Esta idea resulta altamente interesante a la hora de desarrollar estrategias terapéuticas en pacientes que tengan como objetivo modular el SEC y así potenciar los mecanismos compensatorios endógenos de los que este sistema es responsable. Nuestros resultados plantean la existencia en esta enfermedad de un periodo temporal en el que una estrategia terapéutica basada en la activación de CB<sub>2</sub> alcanzará su máxima efectividad. Esto nos induce a preguntarnos si la activación del receptor CB<sub>2</sub> con la administración del agonista selectivo HU308 hubiese tenido mejores resultados de haberse llevado a cabo en etapas previas en nuestro modelo experimental, cuando el papel compensatorio del receptor CB<sub>2</sub> podría ser más relevante para frenar el avance de la patología. Lamentablemente, la ELA es una enfermedad de diagnóstico tardío, por lo que este tipo de estrategia terapéutica podrá desarrollarse cuando se cuenten con las herramientas adecuadas para la detección temprana de la enfermedad.

### **Evaluación del potencial neuroprotector de varios fitocannabinoides en la ELA**

Como ya hemos comentado anteriormente, la ELA continúa siendo una enfermedad sobre la que no existe una terapia farmacológica verdaderamente eficaz. En ciertos casos, como ocurre en España, el Riluzol es el único fármaco utilizado como terapia específica frente a la ELA<sup>12</sup>, mostrando una efectividad muy moderada, ya que es capaz de prolongar la vida de los pacientes de media en 2-3 meses. Esto ha generado la necesidad de búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas. A lo largo de los años se han desarrollado y evaluado sin éxito más de 40 ensayos clínicos con fármacos pertenecientes a diversas categorías terapéuticas, es decir, terapias enfocadas a incidir sobre alguno de los diferentes eventos fisiopatológicos que acontecen en la ELA<sup>5,12</sup>. Bajo nuestro punto de vista, debido a que la ELA es una enfermedad multifactorial, la búsqueda de un tratamiento eficaz debe concebirse desde un enfoque multidiana, ya sea con una terapia combinada, o bien con un compuesto capaz de actuar sobre diversas dianas farmacológicas, potencialmente beneficiosas para luchar contra la progresión de esta enfermedad. En este sentido, como ya se ha mencionado varias veces en esta Tesis Doctoral, consideramos los cannabinoides como excelentes herramientas terapéuticas, idea apoyada por los excelentes resultados que se han obtenido en estudios previos en otras END, que en ciertas ocasiones han derivado en ensayos clínicos<sup>487,488,588</sup>. Además, existen evidencias del potencial de los cannabinoides para el tratamiento sintomático de esta enfermedad (resultados previamente revisados en la introducción de este trabajo). Las características fisiopatológicas de esta enfermedad multifactorial, junto con los cambios observados en el SEC durante el transcurso de la



ELA (que nos da una idea de la implicación del SEC en los mecanismos de respuesta endógenos celulares), hacen de los cannabinoides excelentes candidatos para el tratamiento de la ELA. Los derivados cannabinoides poseen un perfil farmacológico múltiple, mostrando propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antiexcitotóxicas, dando así lugar a una gran disparidad de efectos beneficiosos mediante la modulación del SEC. Por este motivo, una de las principales motivaciones de este trabajo ha sido la búsqueda de estrategias farmacológicas eficaces basadas en compuestos derivados de la planta *C. sativa*. Hemos encontrado en los derivados botánicos cannabinoides una alternativa muy prometedora, ya que estos compuestos se han declarado seguros para otros usos terapéuticos<sup>377,383,488,510,511,588–590</sup>, y se les atribuyen múltiples propiedades interesantes que podrían resultar en la neuroprotección de las MNs. Por un lado, debido a su estructura química, los fitocannabinoides presentan propiedades antioxidantes que les confieren la capacidad de actuar como lavadores de radicales libres, y por lo tanto presentar una ventaja frente a los procesos de que se han observado en esta enfermedad<sup>168,498</sup>. Además, estos compuestos tienen un efecto directo sobre diferentes dianas celulares como los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, los receptores PPAR $\gamma$ , la enzima COX-2, o los canales TRPs<sup>134,339</sup>. De esta forma, los derivados cannabinoides podrían contrarrestar directamente, entre otros, los procesos neuroinflamatorios y el estrés oxidativo que ocurren en la ELA, sumando al efecto antiinflamatorio del receptor CB<sub>2</sub> descrito en el anterior diseño experimental.

En base a todo lo anterior, el objetivo principal del siguiente grupo de experimentos ha sido evaluar el posible beneficio que supone la modulación del SEC, y elementos relacionados con este, por parte de una selección de fitocannabinoides con distintos perfiles farmacológicos de amplio espectro.

Por un lado, evaluamos el potencial terapéutico de tres fitocannabinoides de perfil clásico, es decir, compuestos con capacidad de modular la activación principalmente los receptores cannabinoides canónicos. Concretamente, seleccionamos tres agonistas del receptor CB<sub>2</sub>, el (*E*)-BCP,  $\Delta^9$ -THC y  $\Delta^9$ -THCV, que además presentan diferentes perfiles de actuación sobre otras dianas, como el receptor nuclear PPAR $\gamma$  y los receptores CB<sub>1</sub> y los canales TRPs en el caso del  $\Delta^9$ -THC y  $\Delta^9$ -THCV<sup>134,383</sup>. De los tres fitocannabinoides, los compuestos (*E*)-BCP y  $\Delta^9$ -THCV consiguieron retrasar parcialmente la aparición de alteraciones motoras en los animales TDP43<sup>A315T</sup>. Sin embargo, en estadios finales del tratamiento farmacológico, es decir, en periodos avanzados de la enfermedad, ninguno de los tres fitocannabinoides de perfil clásico mostró efecto mejorando la funcionalidad motora de los animales, e incluso el  $\Delta^9$ -THC y el  $\Delta^9$ -THCV tuvieron un efecto agravando ligeramente el fenotipo motor de los animales TDP43<sup>A315T</sup> en esta etapa final de la patología. Además, tanto el  $\Delta^9$ -THC como el  $\Delta^9$ -THCV tuvieron un efecto perjudicial sobre el peso de los animales, efecto que podría atender a las características farmacológicas clásicas ya descritas para estos fitocannabinoides, y cómo sus modulación del receptor CB<sub>1</sub> altera la conducta alimentaria y el metabolismo lipídico<sup>591–593</sup>. Por un lado, el fitocannabinoides  $\Delta^9$ -THCV, debido a su poca potencia, ejerce cierto antagonismo sobre los receptores CB<sub>1</sub> para sus ligandos naturales<sup>316,335,336</sup>, lo que podría estar alterando las acciones mediadas por este receptor tanto a nivel central, en el áreas del sistema límbico<sup>591,594</sup>, como a nivel periférico, en el tejido adiposo. Por otro lado, si bien el consumo o la administración aguda de  $\Delta^9$ -THC provoca el aumento de la conducta de ingesta, exposiciones crónicas a este fitocannabinoides producen un cambio en el metabolismo lipídico y se relacionan con disminuciones en el índice de masa corporal<sup>595,596</sup>. Se ha descrito en los pacientes de ELA una alteración en el metabolismo energético que contribuye a la patogénesis de esta enfermedad, por lo que la reducción de peso como resultado de los tratamientos con estos dos fitocannabinoides podría estar agravando el estado funcional de los animales,

ya que las MNs parecen ser especialmente vulnerables al estrés energético, y las consecuencias metabólicas de una pérdida de peso acelerada en los animales pueden estar contribuyendo al desarrollo del fenotipo patológico<sup>597,598</sup>. Además, debido a la dosis de  $\Delta^9$ -THC utilizada en este trabajo, no podemos descartar los efectos psicoactivos y la anhedonia que puede estar produciendo en estos animales, modificando su conducta de búsqueda de comida.

En la misma línea, ninguno de estos agonistas del receptor CB<sub>2</sub> ((*E*)-BCP,  $\Delta^9$ -THC y  $\Delta^9$ -THCV) mostraron beneficios preservando la supervivencia de las MNs en la médula espinal de estos ratones. Debido a los estudios previos con el agonista selectivo HU308, esperábamos observar algún efecto neuroprotector tras la activación del receptor CB<sub>2</sub> derivada de los tratamientos con estos tres fitocannabinoides. Ciertos autores han descrito en otros modelos experimentales de ELA el efecto beneficioso de la administración de  $\Delta^9$ -THC, mediante la activación del receptor CB<sub>2</sub>, ya que retrasa el inicio de la sintomatología y aumenta la supervivencia de los animales<sup>599</sup>. A pesar de ello, estos resultados se han obtenido en el modelo de ELA basado en la mutación de SOD1<sup>G93A</sup>, que como ya comentamos anteriormente, presenta una progresión de la enfermedad más paulatina y unas características fisiopatológicas ligeramente diferentes. Por otro lado, datos previos de nuestro grupo mostraron un leve incremento en la funcionalidad motora en los ratones TDP43<sup>A315T</sup> tras el tratamiento con el cannabinoide sintético WIN55,212-2<sup>462</sup>, un compuesto con unas propiedades farmacológicas muy similares a las del  $\Delta^9$ -THC, pero sin embargo con un perfil de activación significativamente más potente<sup>320</sup>. En el caso del agonista selectivo HU308, este compuesto muestra una Emáx casi 10 veces superior a la del fitocannabinoide  $\Delta^9$ -THC<sup>513,600</sup>, por lo que la falta del efecto neuroprotector esperado tras el tratamiento con  $\Delta^9$ -THC en los animales TDP43<sup>A315T</sup> parece deberse a la menor eficiencia de este compuesto en comparación con los cannabinoides sintéticos anteriormente utilizados. Por otro lado, en el caso del  **$\Delta^9$ -THC**, puesto que es un agonista CB<sub>1</sub>, esperábamos haber observado algún efecto antiexcitotóxico traducido en una mejora de la funcionalidad motora en estos animales. Sin embargo, se han descrito ciertas anomalías en cuanto al receptor CB<sub>1</sub> en modelos experimentales de patología, como una sensibilidad anormal del receptor CB<sub>1</sub>, así como una desregulación en el patrón de distribución de este receptor en el modelo de ELA basado en la mutación de SOD1<sup>G93A</sup><sup>492,601</sup>. Por lo tanto, sería necesario comprobar si esta falta de efecto en los animales TDP43<sup>A315T</sup> puede ser debido a alteraciones similares en los receptores CB<sub>1</sub>. Por otro lado, pese a los decepcionantes efectos mostrados tanto a nivel neuroprotector como en la preservación de la funcionalidad motora, el fitocannabinoide  $\Delta^9$ -THC mostró un efecto positivo retrasando la aparición de distonía en los animales. Este efecto podría estar mediado por su potente capacidad antiinflamatoria, ya que hemos observado como el fitocannabinoide  $\Delta^9$ -THC fue capaz de reducir los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en la médula espinal de los animales TDP43<sup>A315T</sup>. Este efecto antiinflamatorio presumiblemente lo ejerció a través de la modulación de los astrocitos, ya que este compuesto no mostró ningún efecto en el cambio morfológico de las células de microglía. En el caso del fitocannabinoide  **$\Delta^9$ -THCV**, a pesar de sus leves efectos a nivel funcional retrasando la distonía y la disfunción motora, este compuesto no mostro efectos neuroprotectores en este modelo, ya que no fue capaz de reducir la pérdida neuronal en los animales. Sin embargo, pudimos observar cierto efecto reduciendo tanto la astrogliosis como la microgliosis en la médula espinal, ejerciendo además un efecto en el cambio morfológico hacia fenotipos ramificados de las células de microglía. Este efecto antiinflamatorio debido a la activación del receptor CB<sub>2</sub> ya había sido anteriormente descrito por Bolognini y colaboradores en un modelo de dolor inflamatorio<sup>333</sup>, en el que la administración de este fitocannabinoide redujo el edema producido tras una inyección de carragenato. A pesar de estos resultados, esto no se tradujo en un cambio en la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias en la médula

espinal, lo que podría indicar la implicación de otras células inflamatorias, como por ejemplo la presencia de infiltrados de macrófagos periféricos. En conjunto, los resultados obtenidos con los tratamientos con  $\Delta^9$ -THCV y  $\Delta^9$ -THC ponen de manifiesto la necesidad de una terapia multidiana para conseguir efectividad frente a esta patología, ya que comprobamos que acciones antiinflamatorias a cierto nivel no resultan en una mejoría global en el estado de los animales. Esto podría explicar por qué en este modelo, a pesar de encontrarse en un ambiente de niveles reducidos de activación glial, las MNs continúan degenerando. De nuevo, constatamos que al igual que en numerosos ensayos clínicos con agentes antiinflamatorios, ejercer un efecto disminuyendo la activación de las células de glía no es suficiente para modular el contexto inflamatorio general y reducir el transcurso de la patología<sup>5</sup>.

El último fitocannabinoides de perfil clásico analizado fue el **(E)-BCP**. Este derivado botánico cannabinoides, por su alto perfil de bioseguridad, está adquiriendo cada vez más presencia en el estudio de enfermedades inflamatorias. Numerosos trabajos han demostrado su potencial antiinflamatorio y antiexcitotóxico en diferentes enfermedades<sup>376,382,602,603</sup>. Concretamente, este cannabinoides, a través de la activación del receptor CB<sub>2</sub>, ha mostrado excelentes resultados frente a la neuroinflamación en un modelos de Esclerosis Múltiple, mejorando la parálisis motora en los animales<sup>381</sup>. Sin embargo, como ya hemos comentado anteriormente, la neuroinflamación crónica tiene unas características particulares que la diferencian de la inflamación aguda que sucede en otras enfermedades. En la ELA, los procesos neurodegenerativos se caracterizan por ser ligeramente más leves pero cronificados en el tiempo. En todos estos tratamientos, incluido en el modelo de Esclerosis Múltiple, la administración de (E)-BCP se produjo de forma temprana en el comienzo de la respuesta inflamatoria. Como hemos podido comprobar por anteriores resultados, el receptor CB<sub>2</sub> presenta una ventana temporal de activación efectiva, en la que su modulación farmacológica obtiene los máximos resultados. El compuesto (E)-BCP presenta una potencia de activación del receptor CB<sub>2</sub> limitada en comparación con el agonista sintético HU308, con una diferencia en dos órdenes de magnitud<sup>377,513</sup>, lo que podría explicar la falta de efecto que encontramos tras este tratamiento farmacológico. Por lo tanto, el tratamiento con (E)-BCP se realizó en concentraciones subóptimas que no fueron capaces de reproducir los efectos neuroprotectores observados en el tratamiento farmacológico anterior<sup>513</sup>. Esta idea parece corroborarla el hecho de que en el tratamiento para Esclerosis Múltiple, los animales fueron tratados diariamente con dos dosis de 25 o 50 mg/kg por un periodo de 30 días<sup>381</sup>, mientras que en nuestros ensayos farmacológicos, la dosis diaria utilizada fue de 10mg/kg.

Por otra parte, analizamos el potencial terapéutico del **CBD, CBDA y CBDV**. Estos fitocannabinoides son considerados compuestos cannabinoides atípicos, ya que sus dianas principales no son los receptores cannabinoides clásicos, sino otros elementos relacionados con el SEC, como las enzimas de síntesis y degradación DAGL, MAGL y FAAH, receptores TRPs, o los receptores nucleares PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ <sup>134</sup>.

Todos los fitocannabinoides de perfil atípico utilizados mostraron una preservación casi total en las poblaciones de MNs del asta ventral de la médula espinal. Debido a la importancia que ha demostrado tener la neuroinflamación en este modelo experimental, creemos que gran parte del efecto neuroprotector que encontramos tras la administración crónica de estos tres agentes terapéuticos se basa en su gran potencial antiinflamatorio<sup>134</sup>. Todos los compuestos de esta serie han mostrado efectos beneficiosos previniendo la activación de las células de glía. La administración del fitocannabinoides CBD, a pesar de no mostrar efecto sobre la inmunorreactividad en los astrocitos, tuvo efectos beneficiosos reduciendo los

niveles de microglia, aunque a nivel morfológico no observamos ningún cambio en las células de microglía tras el tratamiento con este fitocannabinoide. Por otro lado, tanto el CBDA como el CBDV mostraron un potente efecto antiinflamatorio reduciendo la astrogliosis y los niveles de inmunorreactividad de la microglía. Además, atendiendo a la morfología celular de las células de microglía, estos dos compuestos favorecieron el cambio morfológico de esta hacia estados ramificados, lo que, junto con la reducción en los niveles de expresión de citoquinas observada, puede estar indicando un cambio en el fenotipo de activación de las células de microglía<sup>568</sup>. En el caso del fitocannabinoide CBDA esta idea fue corroborada mediante ensayos de citometría de flujo. Por un lado, confirmamos que el cambio morfológico que observamos en las células de microglía tras el tratamiento con CBDA se debe a un cambio en el estado de activación de la microglía, ya que se observa aumento en el porcentaje de células en reposo en los animales transgénicos tratados con CBDA, con respecto a los animales que obtuvieron vehículo. Además, estos resultados nos confirmaron un cambio en el fenotipo de activación en estas células. Así, tras la administración crónica con CBDA, las células de microglía cambian su patrón de expresión de marcadores M1 (mayores niveles de iNOS), a una mayor proporción de expresión de marcadores M2, como la Arginasa1, relacionada con los fenotipos antiinflamatorios<sup>535</sup>. Estos resultados fueron posteriormente corroborados con los experimentos *in vitro* en la línea celular de microglía de ratón inmortalizada BV2. Tras un estímulo inflamatorio, la administración de CBDA tuvo un efecto positivo reduciendo los niveles de expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Este potente efecto antiinflamatorio ha sido descrito en la bibliografía en el estudio de numerosas patologías<sup>240,371,604–607</sup>, sin embargo, hasta los datos de los que disponemos, esta es la primera vez que este compuesto se evalúa en relación a la ELA, mostrando resultados muy prometedores. Por este motivo, continuamos investigando el perfil de actuación de este fitocannabinoide. Una de las dianas de activación descritas para el compuesto CBDA es el receptor PPAR $\gamma$ , un receptor ampliamente relacionado con los procesos antiinflamatorios<sup>234,368,568</sup>. Además, como hemos comentado anteriormente, el receptor CB $_2$  está estrechamente relacionado con los procesos de activación de las células de microglía<sup>455,557,558</sup>. Sin embargo, la combinación de este fitocannabinoide con antagonistas de los receptores CB $_2$  y PPAR $\gamma$  no mostró pérdida de los efectos observados en la línea celular BV2 con la administración del compuesto CBDA solo, e incluso el bloqueo simultáneo de ambos receptores tuvo efectos altamente beneficiosos en el aumento de expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Esto nos indica que, en el caso de los experimentos *in vitro*, el potente efecto antiinflamatorio del fitocannabinoide CBDA no se debe a la modulación directa de estos receptores. Está descrito que este fitocannabinoide puede ejercer sus efectos a través de la modulación dual de los receptores PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$ <sup>368</sup>, por lo que el efecto antiinflamatorio observado en nuestros experimentos *in vitro* podría deberse a la activación del receptor PPAR $\alpha$ . Se ha descrito que el agonista natural del receptor PPAR $\alpha$ , la OEA, participa activamente reduciendo la respuesta inflamatoria en un modelo de aterosclerosis, modulando los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias, como IL6 e IL8, e inhibiendo la vía del factor nuclear NF $\kappa$ B<sup>608</sup>.

A pesar de los buenos resultados preservando las MNs obtenidos tras el tratamiento crónico con toda la serie de fitocannabinoides de perfil atípico (CBD, CBDA y CBDV) nuevamente, este efecto no vino obligatoriamente asociado a una mejora en la funcionalidad motora. En este sentido, sólo el compuesto CBDA fue capaz de mejorar el fenotipo motor en el modelo experimental de ELA basado en la mutación de TDP43<sup>A315T</sup>. Además, la administración de CBDA produjo una mejoría notable en la distonía y espasticidad, observada mediante la reducción del reflejo de clasping. Se han propuesto diferentes mecanismos de acción para este fitocannabinoide, lo que le confiere propiedades multidiana, por lo que nos

resulta difícil esclarecer una única vía por la que el CBDA podría estar ejerciendo sus efectos a nivel funcional. Incluso podríamos estar hablando conjuntamente de mecanismos dependientes e independientes a la modulación del SEC. Anteriormente hemos discutido acerca de la relación que existe entre los procesos de inflamación crónica con la aparición de la espasticidad. Debido a sus características farmacológicas, ciertos trabajos previos han propuesto al fitocannabinoide CBDA como una excelente molécula antiinflamatoria mediante su acción inhibitoria de la enzima COX-2<sup>609</sup>. Además, este compuesto ha mostrado excelentes propiedades antiinflamatorias en nuestros resultados, tanto en los experimentos *in vivo* con el modelo experimental murino de TDP43<sup>A315T</sup> como tras la estimulación *in vitro* de la línea celular BV2. Por este motivo, podríamos relacionar la capacidad antiinflamatoria de esta molécula con la reducción de ciertos signos fisiopatológicos que aparecen en esta enfermedad, como la espasticidad. Por otro lado, varios trabajos han puesto de manifiesto alteraciones en diferentes elementos del sistema serotoninérgico en la ELA<sup>610,611</sup>. Estas alteraciones se han relacionado con diferentes eventos fisiopatológicos característicos de la ELA, como la excitotoxicidad, la activación microglial, alteraciones en el metabolismo energético, y algunos de los defectos motores clásicos de la enfermedad, como la espasticidad<sup>46,610,612–614</sup>. Nuestros resultados muestran una clara mejoría en este parámetro, y este efecto podría ser debido a la modulación del tono serotoninérgico. Tanto por ensayos funcionales como en experimentos *in vivo*, se ha descrito que este fitocannabinoide es capaz de activar los receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> con gran potencia<sup>134</sup>. Además, recientemente se ha desarrollado un análogo más estable, el CBDA metil éster (HU580), que muestra cierto efecto aumentando el tono serotoninérgico<sup>615</sup>, por lo que la administración de CBDA en nuestro modelo experimental podría estar mejorando la espasticidad de los animales, por un lado modulando los niveles de serotonina, y por otro, mediante la activación de los autorreceptores 5HT<sub>1A</sub>, responsables del control excitatorio. Sin embargo, a pesar de que ciertos trabajos han descrito una desregulación del sistema serotoninérgico en modelos experimentales de ELA<sup>613,614</sup>, sería necesario llevar a cabo pruebas en nuestro modelo que confirmen, primero, que existe una desregulación serotoninérgica en estos animales y en segundo lugar, que el CBDA está ejerciendo un efecto positivo a este nivel.

Como ya hemos comentado, otra de las dianas descritas para el fitocannabinoide CBDA son los receptores PPAR. La activación del receptor PPAR $\gamma$  en el tejido nervioso es capaz de mitigar la disfunción de las MNs en modelos de ELA basados en TDP43<sup>616,617</sup>. Este efecto se ha relacionado por una parte con el control que ejerce la activación del receptor PPAR $\gamma$  sobre el metabolismo, regulando la homeostasis energética. Por otra parte, también se ha descrito que la activación del receptor PPAR $\gamma$  ejerce una regulación de la señalización glutamatérgica<sup>616,618</sup>. Por lo tanto, la activación de los receptores PPAR $\gamma$  en el modelo de TDP43<sup>A315T</sup> puede estar ejerciendo un efecto incrementando la activación de los receptores EAAT2 de glutamato, y de este modo reduciendo los procesos de excitotoxicidad y adicionalmente regulando la homeostasis energética de estos animales<sup>619</sup>. Asimismo, se le ha otorgado a los receptores PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$  la capacidad de responder frente a procesos de EO, funcionando como aclaradores de radicales libres<sup>620</sup>. Debido a que el EO es un evento primario en la ELA<sup>618,621,622</sup>, pensamos que el CBDA, mediante la activación de los receptores PPAR $\gamma/\alpha$  está ejerciendo un papel antioxidante. En nuestros resultados, hemos podido constatar como el tratamiento crónico con el fitocannabinoide CBDA es capaz de reducir los niveles de oxidación proteica en el ratón TDP43<sup>A315T</sup>. Además, los fitocannabinoide CBDA y CBDV lograron mantener o incluso prevenir la pérdida de peso corporal típica del modelo durante todo el tratamiento. Este resultado puede estar mostrándonos un efecto positivo de estos tratamientos en la prevención de las alteraciones

metabólicas que se pueden estar dando en este modelo como consecuencia de la patología<sup>598</sup>. Sin embargo, nuestros resultados no corroboran esta última interpretación, por lo que habría que hacer pruebas adicionales para confirmarlo.

Por último, debido a la disfunción motora observada en este modelo experimental, tratamos de caracterizar estructuralmente el músculo esquelético de estos animales, ya que carecíamos de información a este respecto. Además, quisimos tratar de encontrar el efecto diferencial que ejerce el tratamiento con el fitocannabinoide CBDA, por el cual se rescata la funcionalidad en estos animales, ya que anteriores tratamientos consiguieron preservar las MNs y sin embargo no tuvieron éxito a nivel conductual. Tras el análisis histológico del músculo esquelético observamos que no existe atrofia o alteraciones metabólicas musculares en el modelo experimental de ELA. Como ya comentamos anteriormente, en la ELA, se ha descrito el dismantelamiento de la sinapsis en la UNM como uno de los eventos patogénico primarios<sup>559-561</sup>, y este resultado parece confirmarlo, ya que la pérdida de funcionalidad motora en este modelo experimental precede a la atrofia de la fibra muscular.

En resumen, los resultados obtenidos en el tratamiento farmacológico con el fitocannabinoides CBDA nos inducen a pensar en esta molécula como un potencial candidato para continuar la investigación en el tratamiento de la ELA, proponiéndolo como posible complemento a la terapia farmacológica actual en clínica, el Riluzol. Numerosas evidencias clínicas sugieren que el Riluzol tiene una efectividad muy variable, y de manera general el beneficio terapéutico que proporciona es muy modesto<sup>5,623</sup>, por lo que el CBDA también podría establecerse como terapia farmacológica en sí misma, dirigida a los pacientes que muestran resistencia o insensibilidad al Riluzol. Debido a la efectividad que ha mostrado el CBDA en nuestro modelo experimental, y a que su ámbito de actuación parece ser muy diferente al del Riluzol (un agente mayoritariamente anti-glutamatérgico mediante el bloqueo de canales iónicos), el CBDA podría ejercer beneficios sumatorios en el tratamiento actual de la ELA. Como ya mencionamos anteriormente, con este objetivo desarrollamos el Diseño Experimental 3, como parte de la optimización del tratamiento con cannabinoides en la ELA.

Antes de desarrollar esta terapia combinada con el Riluzol, quisimos seleccionar la dosis de ambos compuestos que más se ajustaba a nuestro modelo experimental. Debido a la falta de datos preclínicos robustos y la inconsistencia en los resultados consultados<sup>517-520</sup>, no encontramos en la literatura una dosis óptima establecida para la aplicación de este compuesto en ensayos experimentales. Además, en el momento de la realización de este ensayo farmacológico, nunca se había administrado Riluzol en el modelo transgénico TDP43<sup>A315T</sup>. Por este motivo, decidimos probar dos dosis diferentes en una primera aproximación farmacológica.

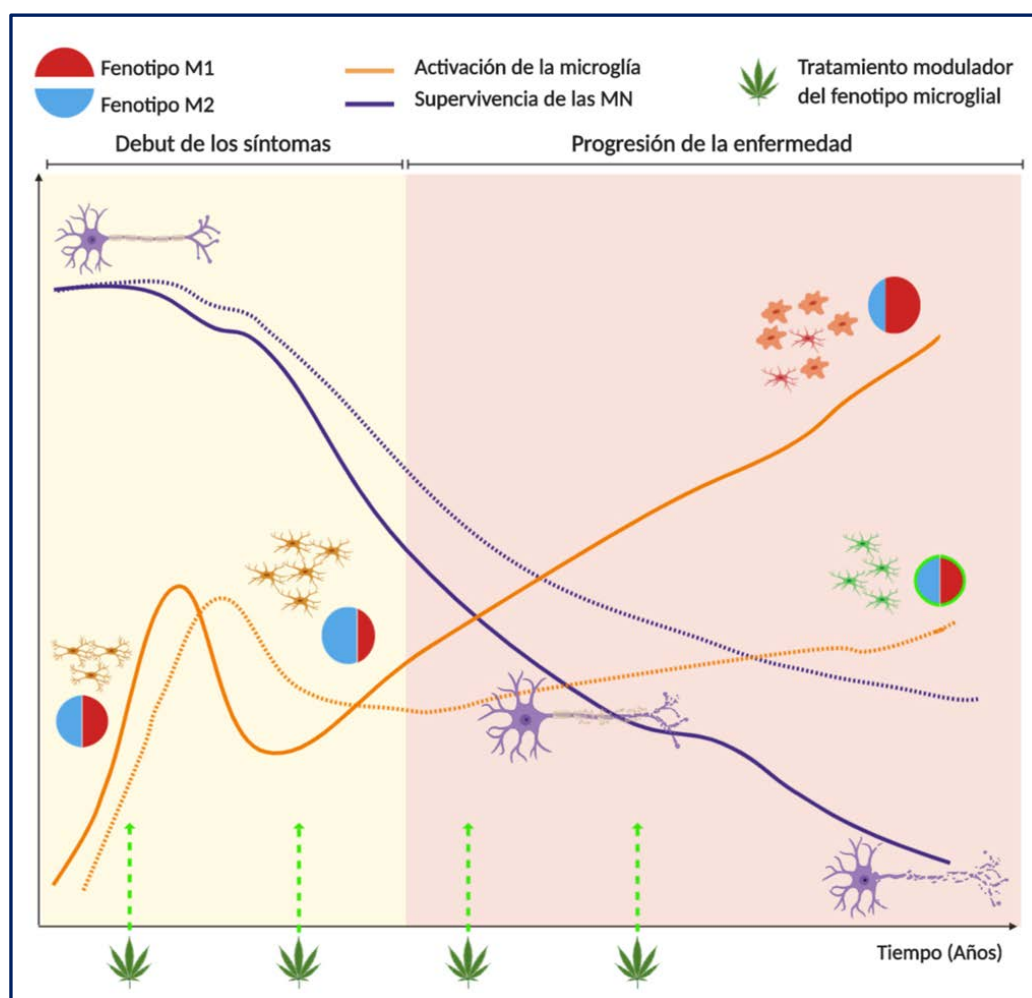
En el caso del CBDA, observamos cómo este compuesto presenta un efecto campana típico de algunos cannabinoides. De este modo, observamos como los efectos beneficiosos producidos responden a un perfil dosis dependiente hasta que, en concentraciones altas de compuesto, el efecto se vuelve perjudicial. Los animales administrados con dosis muy elevadas de CBDA, 100mg/kg, sufrieron una pérdida marcada de peso desde el primer día de tratamiento, lo que nos podría indicar posibles efectos tóxicos. Esta idea fue corroborada al encontrar una disminución en la supervivencia de los animales de este grupo experimental. Por esta razón, se suspendió este tratamiento. Estos resultados son semejantes a los que otros autores han descrito acerca de la toxicidad hepática que presenta la administración crónica de altas dosis del fitocannabinoide CBD, un compuesto estructural y funcionalmente muy relacionado con el CBDA<sup>624-626</sup>. Sin embargo, no

consideramos que este resultado empañe el perfil de bioseguridad que presentan estos dos fitocannabinoides de perfil atípico, ya que la administración farmacológica a dosis de 100mg/kg de manera crónica nunca sería habitual en la clínica. Por otro lado, el resto de las concentraciones de CBDA administradas no mostraron alteraciones significativas en la ganancia de peso de los animales durante el transcurso del tratamiento farmacológico, por lo que fueron consideradas como seguras. Por otro lado, en el caso del Riluzol, la dosis de 10mg/kg ejerció un efecto negativo sobre el peso de los animales en las etapas finales de evolución de la patología. Esta observación se corresponde con los datos observados en pacientes, ya que uno de los mayores efectos adversos encontrados en pacientes son los trastornos gastrointestinales<sup>627,628</sup>.

A nivel funcional, observamos una mejoría notable en la distonía y espasticidad en los animales administrados con ambos compuestos a la dosis de 10mg/kg. Sin embargo, en el caso del Riluzol, esto no se pudo relacionar con un efecto positivo protegiendo a las MNs de la neurodegeneración. Debido a las características farmacológicas del Riluzol, este efecto en la espasticidad puede deberse a su carácter antiglutamatérgico<sup>629,630</sup>, que reduce la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y como consecuencia la activación microglial que observamos<sup>631,632</sup>. Efectivamente, la dosis de 10mg/kg mostró un marcado efecto reduciendo la microglía reactiva. Se ha descrito la capacidad del Riluzol de modular la activación de la microglía mediante la activación de los canales de potasio activados por calcio SK3 y SK4<sup>631</sup>, efecto que este agente terapéutico podría estar ejerciendo en nuestro modelo experimental. Sin embargo, contrariamente a lo que esperábamos por su perfil antiglutamatérgico, el tratamiento con Riluzol 10mg/kg no tuvo un efecto beneficioso sobre la población de astrocitos, y en el caso de la administración a 5mg/kg observamos un efecto incrementando los niveles de reactividad astrogliar, un efecto pro-activación de los astrocitos, anteriormente descrito en la bibliografía<sup>633</sup>. El fitocannabinoide CBDA reprodujo los efectos neuroprotectores y antiinflamatorios observados en anteriores ensayos experimentales (Diseño Experimental 2), aunque el efecto producido fue ligeramente menos marcado en el caso de la microglía. Por este motivo, achacamos a la menor actividad antiinflamatoria del tratamiento de CBDA, observada en una reducción del efecto sobre la activación de la microglía, el hecho de no encontrar ningún efecto a nivel de los astrocitos. Como pudimos comprobar en los resultados de citometría, el CBDA parece tener un efecto directo sobre el fenotipo de activación de las células de microglía, y estas células, a su vez, parecen ejercer cierto efecto modificando el perfil de liberación de citoquinas de los astrocitos, efecto mostrado en los resultados de los medios condicionados. Por lo tanto, en este caso, parece lógico pensar que la microglía pueda estar ejerciendo un efecto modulador de menor intensidad sobre la activación astrocitaria.

En relación con esta reducción de los efectos mostrados, en este ensayo farmacológico no observamos el efecto preservando la funcionalidad motora anteriormente observado. Esta inconstancia de resultados funcionales podría deberse a la variabilidad que hemos observado en la severidad de los diferentes eventos fisiopatológicos que se desarrollan en este modelo murino de ELA. Como ya comentamos anteriormente, tanto la ELA, como los modelos experimentales que la estudian, presentan una ventana de efectividad terapéutica delimitada (**Figura 92**). Debido a esto, creemos que es esencial localizar el momento adecuado para optimizar las terapias y así potenciar la efectividad de los tratamientos farmacológicos. En otros modelos experimentales, como en el caso de los modelos basados en SOD1<sup>G93A</sup>, la estandarización del inicio sintomático se lleva a cabo de una manera diferente y los animales son reclutados para el ensayo en función de la aparición de signos motores de disfunción, como temblores, aparición de reflejos de claspings o alteraciones en la

marcha. En el caso de nuestro modelo experimental genético, hemos establecido una ventana terapéutica entre los 65, momento en el que se inician los síntomas, a los 90 días de edad, cuando estos se agravan de manera irreversible. De este modo, estamos asumiendo un debut homogéneo de la sintomatología. Lamentablemente, la aparición de los síntomas en los animales TDP43<sup>A315T</sup> tiene cierta variabilidad temporal y en severidad, por lo que este inicio no siempre se corresponde con los 65 días de edad, y el avance de la sintomatología no es constante. Este puede ser el motivo por el que los resultados experimentales en ambos experimentos con el fitocannabinoides CBDA no han resultado homogéneos. Por otro lado, esta variabilidad de resultados también podría deberse a cierta pérdida de efectividad del compuesto, ya que el CBDA es un



**Figura 92. Efecto de la modulación terapéutica de la microglía en la progresión de la ELA.** Adaptado de Tang et al. 2016.

compuesto ligeramente inestable, lo que nos lleva a pensar que la prueba de Rotarod en aceleración podría presentar una sensibilidad limitada cuando se enfrenta a pequeñas diferencias fenotípicas. Tenemos constancia de esta inestabilidad del CBDA por información de la empresa que nos lo suministra, GW Pharma, ya que los intentos que han realizado para intentar formular el CBDA para estudios clínicos en pacientes han resultado imposibles por la descarboxilación del CBDA a CBD. Es posible que esto haya podido pasar en parte del Stock de CBDA utilizado en los experimentos de la curva de dosis de CBDA y en los de combinación con Riluzol. Para solucionarlo, estamos a punto de realizar nuevos experimentos con el derivado de CBDA, el compuesto HU580, ya mencionado anteriormente, y que ha sido sintetizado por el grupo de Rapahel Mechoulam<sup>634</sup>.



En conjunto, los resultados obtenidos nos llevaron a seleccionar la dosis de 10mg/kg de ambos compuestos. En el caso del Riluzol, por sus efectos sobre la activación de la microglía y su posible efecto de esto en la reducción de aparición de distonía y espasticidad, mientras que en el caso del CBDA por ser la dosis que mostró los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores más robustos. Una vez seleccionadas las dosis óptimas de ambos compuestos, llevamos a cabo el tratamiento farmacológico combinado. En cuanto a los parámetros comportamentales, ningún tratamiento mejoró la funcionalidad motora de los animales TDP43<sup>A315T</sup>, aunque el tratamiento con Riluzol mostró una ligera mejoría en las etapas finales del ensayo farmacológico. Sin embargo, este retraso en la disfunción motora no se vio acompañado de un efecto neuroprotector, ya que de nuevo no observamos la conservación de las MNs tras 25 días de tratamiento. Por otro lado, el fitocannabinoide CBDA mostró de nuevo un efecto neuroprotector preservando las MNs de la médula espinal. Por último, comprobamos que la estrategia terapéutica combinada no se tradujo en mejoría de los parámetros funcionales, y estos animales mostraron la peor evolución en la funcionalidad motora de todos los tratamientos analizados. Sin embargo, el tratamiento combinado sí ejerció un efecto positivo sobre la supervivencia de las MNs de la médula espinal, aunque este fue más leve que el del tratamiento con CBDA en exclusividad, por lo que lo asociamos al efecto exclusivo del CBDA. En los análisis histológicos de activación glial de nuevo validamos el potencial antiinflamatorio que presenta el fitocannabinoide CBDA. Sin embargo, en el caso del Riluzol no encontramos el efecto positivo esperado. Esta variabilidad de efectos en el caso del Riluzol ha sido previamente descrita en la bibliografía<sup>515</sup>. Ensayos clínicos en pacientes han mostrado gran variabilidad inter sujeto en la efectividad del Riluzol debido a polimorfismos en la enzima hepática citocromo P450, principal responsable del metabolismo de este fármaco. Concretamente, alrededor del 30% de la variabilidad en la eficacia se achaca a polimorfismos en la CYP1A2<sup>515</sup>.

La combinación de ambos compuestos bloqueó el efecto observado tras el tratamiento con el fitocannabinoide CBDA por separado, lo que parece estar indicándonos una interacción negativa del efecto del Riluzol sobre la capacidad antiinflamatoria del CBDA. Este resultado podría explicar por qué los animales tratados con ambos compuestos presentaron una potencia neuroprotectora atenuada, que, por otro lado, se debe principalmente al efecto que ejerce el CBDA sobre la supervivencia de las MNs. De nuevo, observamos un efecto positivo de la administración de CBDA sobre la astrogliosis de los animales. Como en anteriores ocasiones, interpretamos este resultado como una consecuencia de la inducción de un cambio en el fenotipo de activación de las células de microglía (**Figura S6**), lo que genera un ambiente antiinflamatorio que desencadena un cambio en la respuesta astrocitaria<sup>635</sup>.

En definitiva, la administración conjunta con Riluzol no parece ejercer ningún beneficio sumatorio al tratamiento farmacológico con CBDA en nuestro modelo experimental. Esto puede deberse a que, en este modelo, la inflamación adquiere un papel altamente relevante en los procesos neurodegenerativos, y la estrategia farmacológica más efectiva es la que se centra en este evento. Por otro lado, los efectos a nivel de la activación microglial del Riluzol han resultado poco consistentes en los animales TDP43<sup>A315T</sup>, mientras que el tratamiento con CBDA ha resultado ser constante en su efecto antiinflamatorio. Como ya adelantábamos, nuestros resultados en la microgliosis parecen indicar que el Riluzol está bloqueando la capacidad antiinflamatoria de estas células. Recientemente se le ha atribuido un nuevo mecanismo de acción al Riluzol como inhibidor de la caseína quinasa 1δ (CK1δ)<sup>636,637</sup>. Esta proteína participa activamente en la fosforilación de la proteína TDP43, lo que contribuye a la patogénesis de la ELA. En el caso de este modelo experimental,

tras el tratamiento crónico con Riluzol a 10mg/kg, observamos una reducción de los niveles de fosforilación de TDP43<sup>A315T</sup> (Figura S5), lo que parece confirmar este efecto como inhibidor de quinasas. Por otra parte, la proteína la CK1δ también está involucrada en la regulación de la fagocitosis durante los procesos de autofagia selectiva<sup>638</sup>, como puede ser la autofagia llevada a cabo por las células de microglía como mecanismo neuroprotector<sup>466,557</sup>. De hecho, se ha visto un incremento en la expresión de CK1δ en células gliales en muestras de pacientes de ELA<sup>639</sup>, lo que podría indicar un efecto neuroprotector endógeno incrementando la capacidad fagocítica de estas células para tratar de mitigar y reparar el daño en estos tejidos<sup>102,103,586</sup>. Debido a que el tratamiento con CBDA promueve la activación alterativa de las células de microglía hacia fenotipos M2, y por su perfil de expresión de citoquinas, podría ser tanto M2b como M2c<sup>568</sup>, dos estados caracterizados por su alta capacidad fagocítica, proponemos que la acción inhibitoria del Riluzol sobre la CK1δ podría estar bloqueando la activación alternativa de las células de microglía derivada del tratamiento con CBDA. Por lo tanto, en este caso podemos encontrar un solapamiento de la acción de ambos compuestos que se traduce en una reducción de la capacidad fagocítica de la microglía. Esta posible interacción ha sido descrita en anteriores ocasiones. Tanto ensayos clínicos como experimentos con modelos animales han observado grandes efectos del Litio retrasando la progresión de la enfermedad mediante el incremento de la autofagia<sup>507,508</sup>. Sin embargo, los ensayos clínicos derivados de este descubrimiento, mostraron como la administración conjunta de Litio con Riluzol no tenía los efectos esperados<sup>509</sup>.

Con todos los datos obtenidos en mente, cabría plantearse si la estrategia más adecuada para la combinación farmacológica debería ser separada en el tiempo. Puesto que en este ensayo el Riluzol ha tenido buen efecto a nivel funcional, y que como sabemos en la ELA el momento y el lugar lo determina todo, sería interesante plantearse un tratamiento farmacológico combinado a dos etapas: en estadios presintomáticos y con la funcionalidad motora intacta, tratar de amplificar la respuesta antiinflamatoria compensatoria que está ejerciendo el receptor CB<sub>2</sub>, ya sea directamente, con un agonista CB<sub>2</sub>, o mediante el empleo de moléculas con alta efectividad antiinflamatoria como es el CBDA, que además es capaz de dirigir el fenotipo de activación de las células de microglía promoviendo la liberación de moléculas antiinflamatorias protectoras. Por otro lado, nuestros resultados obtenidos en este modelo experimental de ELA parecen indicar que, una vez avanzada iniciada la enfermedad, en la etapa de sintomatología media, la estrategia farmacológica a seguir puede atender a las alteraciones que ocurran en otros eventos fisiopatológicos, como puede ser la excitotoxicidad o el estrés oxidativo.

### Estudio del papel del SEC en un modelo de ELA en *C. elegans*.

El último apartado de esta Tesis Doctoral se ha centrado en la utilización de un modelo experimental de ELA desarrollado en el nemátodo *C. elegans*. Como ya comentamos anteriormente, por su simplicidad estructural y su fácil manejo, estos animales están adquiriendo cada vez más importancia en el ámbito de la investigación de las END. Durante el desarrollo de parte del trabajo recogido en esta Tesis Doctoral, en ocasiones no hemos podido esclarecer completamente los mecanismos de acción por los que los fitocannabinoides estudiados ejercían sus efectos, en parte por la complejidad que presenta la modulación del SEC en el SN de los mamíferos. Por este motivo, nos pareció una excelente oportunidad poder aplicar nuestros conocimientos sobre el SEC en estos modelos de ELA basados en *C. elegans*, ya que es un animal sencillo, de fácil manejo, y que permite hacer una relación directa causa-efecto en un organismo vivo completo. Además, este

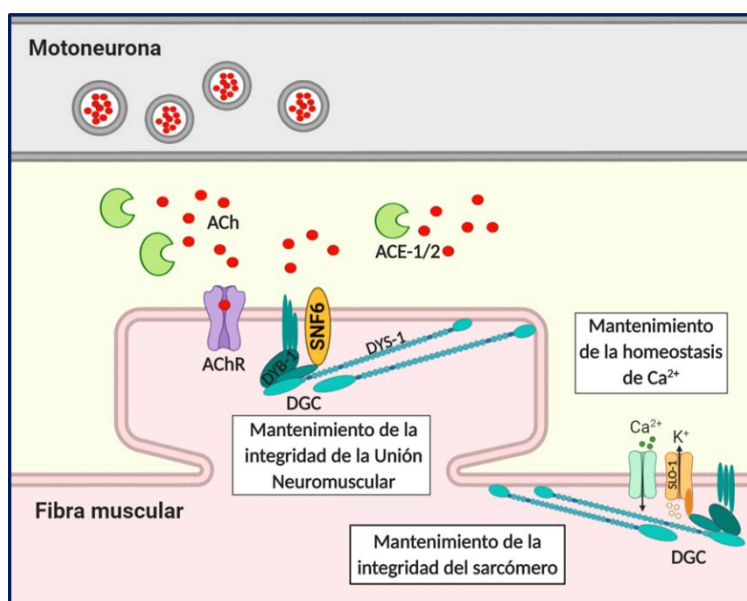
animal permite su modificación genética con relativa facilidad, lo que lo convierte en una excelente herramienta experimental. Por estos motivos, en el contexto de mi estancia predoctoral, tuve la oportunidad de formarme en el mantenimiento y manejo del animal de experimentación *C. elegans*, y de establecer las bases de un estudio, por el momento preliminar, que pone de manifiesto que estos modelos experimentales son una herramienta de futuro para nuestro grupo de investigación.

La hipótesis principal que nos planteamos en este desarrollo experimental fue que, debido a la relevancia que presenta el SEC en la fisiopatología de la ELA, este sistema, altamente conservado en la filogenia<sup>522,523,640</sup>, podía presentar en los modelos experimentales de ELA en nemátodos una desregulación similar a la encontrada tanto en pacientes como en modelos experimentales murinos<sup>184,189,494</sup>. Para validar esta hipótesis, nuestro principal objetivo fue evaluar el estado del sistema de señalización endógeno de tipo cannabinoides (SSEC) en varios modelos experimentales de ELA desarrollados en *C. elegans*. Previamente, evaluamos funcional e histológicamente estos modelos de nemátodo basados en la sobreexpresión de diferentes mutaciones de la proteína humana TDP43<sup>521</sup>, en busca de las alteraciones fisiopatológicas típicas de esta patología encontradas en otros modelos experimentales de ELA, para estudiar su posible relación con una desregulación del SSEC.

La primera observación que pudimos hacer es que, tal y como esperábamos por la descripción previa del modelo<sup>521</sup>, las inserciones de la proteína humana mutada TDP43<sup>A315T</sup> y TDP43<sup>M337V</sup> en nemátodo provocan una marcada disfunción en la locomoción en la etapa correspondiente al estadio larvario L4, periodo de desarrollo correspondiente con etapas sintomáticas tempranas de la enfermedad en estos modelos experimentales de ELA. Esta disfunción se agrava con el avance de la patología, por lo que encontramos alteraciones de la motilidad más severa en los animales al alcanzar el estadio adulto de un día. En el caso de los animales portadores de la mutación con la mutación A315T, encontramos un fenotipo patológico más marcado, resultado que se ha relacionado con los niveles de fosforilación de TDP43 que presentan cada uno de estos modelos experimentales<sup>521</sup>.

A pesar de que estos modelos son muy utilizados en el laboratorio de referencia, no existían datos en detalle de las posibles alteraciones a nivel funcional del músculo esquelético en estos animales. Por este motivo, llevamos a cabo el

análisis de marcadores musculares en la edad adulta, que nos mostró una alteración en los niveles de expresión de varios elementos esenciales para el correcto funcionamiento muscular. Concretamente, observamos una desregulación a la baja para el transportador de recaptura de acetilcolina (ACh), el SNF-6, en ambos modelos experimentales de ELA. Además, observamos una desregulación de los elementos del DGC analizados. El transportador de ACh SNF-6 tiene un papel



**Figura 93. Esquema simplificado de la unión Neuromuscular en el nemátodo *C. elegans*. Principales funciones del DGC. Adaptado de Gieseler et al 2017.**

esencial en el aclaramiento ACh en condiciones de alta actividad muscular<sup>641</sup>. La alteración en este transportador, y por tanto en los procesos de recaptura de ACh, conlleva a un incremento en el tiempo de la estimulación de la sinapsis neuromuscular (SNM) por parte de la ACh liberada a la brecha sináptica. Como consecuencia de este aumento de activación colinérgica, y por tanto de excitación de la fibra muscular, se produce la degeneración de elementos del citoesqueleto responsables del mantenimiento de la SNM<sup>641</sup>. En los animales TDP43<sup>A315T</sup> y TDP43<sup>M337V</sup> hemos observado una reducción en la expresión de los genes que codifican para diferentes elementos del DGC, lo que nos está indicando una pérdida en la estabilidad de las SNM<sup>544,642</sup> (**Figura 93**). Un incremento exacerbado en la activación de contracción muscular debido a hiperexcitabilidad de las MN podría relacionarse con la aparición de espasticidad que en ocasiones se observa en los pacientes con ELA<sup>643,644</sup> y que nosotros hemos observado en los resultados de esta Tesis Doctoral en el modelo murino con el que trabajamos en. De hecho, ciertas terapias estudiadas para mitigar este signo se ha centrado en el bloqueo farmacológico de las sinapsis colinérgicas<sup>645</sup>. Adicionalmente, encontramos una tendencia a reducirse en los niveles de expresión del factor de transcripción muscular *hlh-1* en los animales en estadio adulto de un día, etapa correspondiente a una marcada disfuncionalidad motora. Este factor de transcripción se encuentra alterado en las miopatías severas, y se relaciona con la capacidad regenerativa del músculo tras un daño. De hecho, alteraciones funcionales del factor de transcripción MyoD, el ortólogo humano del factor HLH-1, se relacionan con una alteración en los programas de diferenciación miogénica de las células satélite musculares<sup>541,646</sup>. Por lo tanto, en el caso de los nemátodos con la expresión de la proteína TDP43 mutada, podríamos relacionar la disminución de los niveles génicos del factor miogénico *hlh-1* con una alteración en la capacidad regenerativa muscular de estos animales. A nivel estructural, solo encontramos una alteración en los niveles de *unc-54*, gen que codifica para la cadena pesada de la miosina B. Por otro lado, analizamos otros elementos responsables del mantenimiento de la integridad de la fibra muscular sin encontrar alteraciones aparentes. Este resultado se corresponde con las observaciones realizadas en los músculos de los modelos mutantes generados con la expresión del gen reportero Myo-3-RFP, en los que no observamos ninguna alteración estructural del sarcómero de la pared muscular de los nemátodos, independientemente de su genotipo (**Figura S7**).

En conjunto, el análisis de la funcionalidad muscular parece estar indicándonos un proceso progresivo de degeneración muscular, en el que inicialmente se produce una pérdida de funcionalidad, sin afectar a la estructura muscular de los animales. Este resultado parece indicarnos que, en el modelo de ELA en nemátodos, la neurodegeneración de las MNs precede a la degeneración de la fibra muscular. Concretamente, estos dos modelos experimentales de ELA muestran una marcada pérdida de las MNs GABAérgica desde estadios larvarios L1 y L2<sup>521</sup>, aunque en estas etapas de desarrollo no encontramos alteraciones aparentes en la funcionalidad motora. Por lo tanto, parece que la degeneración funcional que está ocurriendo en estos animales, inicialmente altera la comunicación músculo-neurona, antes de que podamos observar signos patológicos en la fibra muscular. Curiosamente, este resultado se corresponde con lo observado en nuestro modelo experimental de ratón basado en una mutación en el gen *tardbp*, y que expresa la proteína humana TDP43<sup>A315T</sup>. Por lo tanto, nos encontramos frente a dos modelos experimentales de ELA, basados en la expresión de la proteína TDP43 mutada, en lo que observamos un defecto funcional que inicialmente no viene acompañado de atrofia muscular. Estos resultados nos indican que es necesario estudiar la funcionalidad motora con más detalle.

Una vez descritos los defectos funcionales a nivel muscular en los nemátodos portadores de las diferentes mutaciones de la proteína TDP43, evaluamos el sistema de señalización de tipo endocannabinoide (SSEC) en el transcurso de la patología de este modelo experimental, ya que nunca se había analizado su implicación en un modelo de ELA en nemátodo. Los elementos que conforman este sistema son ortólogos del SEC de mamíferos que a grandes rasgos funcionan como análogos funcionales<sup>522,523</sup>. En estadios de desarrollo adulto, periodo de marcado deterioro de la función locomotora, observamos una disminución manifiesta de todos los receptores con actividad cannabinoide analizados. Asimismo, en esta etapa del desarrollo, pero no en los estados larvarios, encontramos una reducción en los niveles de expresión de las enzimas de síntesis de los ligandos endocannabinoides nape-1, nape-2 y dagl2. Sin embargo, no encontramos alterados los niveles de expresión génica de las enzimas de degradación FAAH-1, FAAH-2 y FAAH-3. Debido a la precoz muerte de las MNs GABAérgica en estos animales<sup>521</sup>, asociamos este resultado a la pérdida masiva de los sustratos celulares donde se encuentran expresados estos receptores. Por lo tanto, postulamos que el SSEC de los nemátodos se encuentra localizado en las MNs que degeneran durante la progresión de la enfermedad en estos modelos experimentales, lo que pone de manifiesto la relevancia que tiene el SSEC en la patología.

Teniendo en cuenta estos resultados, tuvimos la oportunidad de llevar a cabo un tratamiento farmacológico con el endocannabinoide AEA, en un intento de potenciar la actividad cannabinoide en estos animales. Tal y como está descrito en la bibliografía<sup>522</sup>, el tratamiento con dosis altas de AEA ejerció un potente efecto hipolocomotor en nuestros animales control. Sin embargo, achacamos este efecto a la administración aguda del compuesto, ya que tras 24h en ausencia de tratamiento los animales presentaban un comportamiento locomotor normal. Por otro lado, tras el tratamiento farmacológico de 24h con AEA en los animales TDP43<sup>A315T</sup>, en las edades comprendidas entre los estadios larvarios L2 y L4, observamos un efecto positivo en los parámetros locomotores tanto tras una hora de prueba (dosis de 250  $\mu$ M) como 24h después (dosis de 5 $\mu$ M), aumentando su capacidad locomotora en relación con los animales TDP43<sup>A315T</sup> tratados con vehículo. Este resultado nos indica que el tratamiento con AEA ejerce un beneficioso en la funcionalidad motora en estos animales. Así, inmediatamente después del tratamiento con AEA, los animales con la administración máxima del compuesto vieron incrementados sus parámetros locomotores. Además, tras un periodo de lavado de 24h, el tratamiento de AEA a 5 $\mu$ M produjo una modulación del SSEC ejerciendo beneficio a nivel funcional respecto a los animales tratados con vehículo. Este resultado nos resulta altamente interesante, ya que los animales que presentan la mutación A315T mostraron un grado de severidad fenotípica muy alta, y el tratamiento con el endocannabinoide AEA fue capaz de mejorar los resultados de las pruebas funcionales. Debido a la temprana pérdida del receptor NPR19 que presentan estos animales, intuimos que este efecto puede ser debido a la modulación de otros receptores cannabinoides, como por ejemplo los receptores NPR32. Ciertos trabajos han encontrado en estos animales un fenómeno que se conoce como redundancia de función, por el que ciertas proteínas son capaces de compensar las disfunciones de otras<sup>523</sup>.

En el caso del modelo experimental de TDP43<sup>M337V</sup>, no encontramos diferencias significativas tras el tratamiento con AEA en ninguna de las etapas estudiadas. En este caso, la AEA no pareció ejercer ningún efecto preservando la funcionalidad motora, e incluso en ciertas dosis observamos el efecto hipolocomotor anteriormente descrito. Debido a la implicación del receptor SER-4 (5-HT<sub>1A</sub>) en los efectos de la AEA, generamos un modelo animal de dobles mutantes que careciera de este receptor, para tratar de dilucidar el mecanismo de acción de la AEA en este modelo. Los animales TDP43<sup>M337V</sup> con la

ausencia funcional del receptor SER4 (5-HT<sub>1A</sub>) vieron incrementado su fenotipo locomotor tras el tratamiento con AEA 5  $\mu$ M, tanto en agudo como tras 24 horas de lavado. Esto parece indicarnos que la AEA presenta varias dianas en los nemátodos, lo que puede diluir sus efectos. Por lo tanto, en el caso de los animales TDP43<sup>M337V</sup>;ser4<sup>-/-</sup>, el aumento del fenotipo locomotor observado tras la administración de AEA no se deben a su acción sobre los receptores serotoninérgicos, sino presumiblemente a través de los receptores del SSEC NPR19 o NPR32. Además, el efecto hipolocomotor observado en los animales TDP43<sup>M337V</sup> tras la administración de AEA a altas dosis se perdió en ausencia del receptor de serotonina SER-4, tal y como estaba descrito en la bibliografía<sup>522</sup>.

Por último, debido a la implicación que mostró el sistema serotoninérgico en el tratamiento farmacológico, evaluamos la posible alteración en este sistema en estos modelos experimentales. Estudios previos han descrito una alteración en las vías de transmisión serotoninérgicas tanto en pacientes con ELA como en otros modelos experimentales<sup>611,647–650</sup>, y estas se relacionan con los eventos fisiopatológicos que acontecen en esta enfermedad. Por este motivo, nos pareció interesante evaluar el estado de estos sistemas en los nemátodos con las inserciones de la proteína TDP43 mutada. Observamos una marcada alteración en el sistema serotoninérgico. Al igual que en otros modelos experimentales y en los estudios realizados en pacientes, ambos nemátodos con la mutación de TDP43 mostraron una disminución de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, receptores que están implicados en el control del movimiento en estos animales<sup>522</sup>. El sistema serotoninérgico, mediante su efecto inhibitorio, juega un papel muy relevante en el control de la excitabilidad de las MNs. En la ELA, alteraciones en la regulación negativa de la liberación de glutamato se han relacionado con un incremento en la excitotoxicidad y consecuente daño de las MNs<sup>651</sup>. Los resultados obtenidos en este modelo experimental ponen de manifiesto en un modelo experimental adicional la importancia de la señalización serotoninérgica en esta patología.

En suma, nuestros resultados en los modelos desarrollados en nemátodo ratifican la importancia del SEC en esta END, y parecen validar la modulación del SEC como potencial estrategia terapéutica frente a la ELA.

## **Resumen de la discusión**

En resumen, los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral nos han permitido conocer un poco más en detalle ciertos mecanismos implicados en la fisiopatología de la ELA, tomando especial relevancia la modulación de la activación de las células de microglía. Además, gracias a las diferentes aproximaciones experimentales llevadas a cabo, se ha podido ratificar el importante papel compensatorio que ejercen ciertos elementos del SEC en el desarrollo de esta patología, en especial el receptor CB<sub>2</sub>. Teniendo en cuenta esta implicación del SEC en los mecanismos de respuesta endógenos, hemos querido potenciar su actividad mediante el uso de derivados botánicos cannabinoides con alto perfil de bioseguridad. En este sentido, el CBDA ha mostrado ser un excelente candidato para desarrollar nuevas terapias farmacológicas por su perfil de actuación múltiple, lo que le dota de cierta ventaja frente a las terapias desarrolladas hasta la actualidad, enfocadas principalmente a la resolución en exclusiva de uno de los eventos patogénicos que se desarrollan durante la enfermedad.







# **CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son:

1. La sobreexpresión del receptor CB<sub>2</sub> en el modelo de ELA basado en la proteína TDP43<sup>A315T</sup> responde a un mecanismo endógeno protector, y su activación farmacológica desde periodos tempranamente sintomáticos es capaz de ejercer un efecto neuroprotector, ya que preserva las MN y es capaz de reducir la activación de las células de microglía en la médula espinal de los animales.
2. Tanto el bloqueo farmacológico como la delección del receptor CB<sub>2</sub> aceleran la aparición de la sintomatología motora de los animales, así como de la aparición de gliosis y la degeneración neuronal. Sin embargo, no incrementa la severidad de la fisiopatología una vez alcanzadas las etapas avanzadas de la enfermedad.
3. Los fitocannabinoides  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCV, CBDA y CBDV presentan propiedades terapéuticas que los hacen potencialmente beneficiosos frente a ciertos eventos fisiopatológicos que se desarrollan en la ELA, especialmente frente a la neuroinflamación.
4. El fitocannabinoides CBDA reduce la disfuncionalidad motora en los animales TDP43<sup>A315T</sup>, además de prevenir la muerte neuronal, los procesos de oxidación celular y la sobreactivación glial.
5. El CBDA ha mostrado además excelentes propiedades antiinflamatorias al ser capaz de reducir la microgliosis y favorecer un cambio en el fenotipo de activación de estas células hacia uno reparador (M2), promoviendo así un ambiente antiinflamatorio protector. Además, el cambio en el perfil de activación de las células de microglía tras la administración de CBDA es capaz de producir un cambio en el perfil de activación de los astrocitos.
6. El bloqueo simultáneo de los receptores CB<sub>2</sub> y PPAR $\gamma$  no revierte las propiedades antiinflamatorias del fitocannabinoides CBDA, por lo que este compuesto parece actuar sobre otros receptores de función similar.
7. Al igual que ocurre en los pacientes, el tratamiento farmacológico con el agente anti-glutamatérgico Riluzol mostró efectos beneficiosos leves y variables en el modelo experimental de TDP43<sup>A315T</sup>.
8. La coadministración de CBDA y Riluzol no mejoró los efectos beneficiosos del tratamiento con CBDA de forma individual. Esta ausencia de efecto sumatorio, probablemente se deba al efecto opuesto que ambos compuestos ejercen sobre la microglía, factor clave en la fisiopatología de esta enfermedad en el modelo experimental murino con el que trabajamos.
9. El SEC se encuentra alterado en dos modelos de ELA desarrollados en *C. elegans*, y su modulación mediante la aplicación de ligandos exógenos mejora el fenotipo locomotor de estos animales.
10. La mutación de TDP43<sup>A315T</sup> provoca defectos funcionales, pero no estructurales, en el músculo esquelético de los animales, tanto en ratones como en nemátodos. Parece que las alteraciones en la conexión músculo-neurona preceden a la atrofia muscular.



In summary, the conclusions of this Doctoral Thesis are:

1. Since there is an endogenous neuroprotective upregulation of the CB<sub>2</sub> receptor in the ALS TDP43<sup>A315T</sup> mice, the pharmacological activation of CB<sub>2</sub> from early symptomatic periods can enhance the endogenous neuroprotective response since it preserves the MNs and can reduce the activation of microglial cells in the spinal cord of the animals.
2. Both pharmacological blocking and CB<sub>2</sub> receptor deletion accelerates the onset of motor symptoms in the ALS TDP43 mice, as well as arise of gliosis and neurodegeneration. However, this functional block does not increase pathological severity at the advanced stages of the disease.
3. The therapeutic properties of Phytocannabinoids  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCV, CBDA y CBDV make these compounds potentially beneficial against certain pathophysiological events that occur in ALS, specially neuroinflammation.
4. Phytocannabinoid CBDA reduces motor dysfunction in TDP43<sup>A315T</sup> animals and prevents neuronal death, protein oxidation, and glial overactivation.
5. CBDA has shown an excellent anti-inflammatory profile as it can decrease microgliosis and change the phenotype of activation of these cells towards a repairing one (M2), thus promoting a protective anti-inflammatory environment. CBDA promotes changes in the microglial cells' activation profile and, consequently, this boosts an adjustment in the astrocytes activation profile.
6. Blocking together the CB<sub>2</sub> and PPAR $\gamma$  receptors does not reverse the anti-inflammatory properties of the phytocannabinoid CBDA, so this compound seems to exert the activation of other receptors with similar functions.
7. As in patients, drug treatment with the anti-glutamatergic agent Riluzole showed mild and variable beneficial effects in the experimental model of TDP43<sup>A315T</sup>.
8. Co-administration of CBDA and Riluzole did not improve the beneficial effects of CBDA treatment alone. This lack of additive effects is probably due to an antagonistic effect that both compounds have on the microglia, a crucial factor in the physiopathology of the disease in the TDP43<sup>A315T</sup> mice model.
9. The Endocannabinoid-*like* System is disrupted in two *C. elegans* ALS models, and its modulation through the application of exogenous ligands improves the locomotion in these animals.
10. The TDP43<sup>A315T</sup> mutation causes functional but not structural defects in the skeletal muscle of the animals, both in mice and nematodes. It seems that alterations in the muscle-neuron connection precede muscle atrophy.











# **BIBLIOGRAFÍA**

---



1. Tiryaki, E. & Horak, H. A. ALS and other motor neuron diseases. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **20**, 1185–1207 (2014).
2. Yedavalli, V. S., Patil, A. & Shah, P. Amyotrophic lateral sclerosis and its mimics/variants: A comprehensive review. *Journal of Clinical Imaging Science* vol. 8 (2018).
3. Talbot, K. Amyotrophic lateral sclerosis: Cell vulnerability or system vulnerability? *J. Anat.* **224**, 45–51 (2014).
4. Dellefave, L. Amyotrophic Lateral Sclerosis Overview Clinical Manifestations of ALS. *Amyotroph. Lateral Scler.* 1–26 (2007).
5. Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A. & Hermine, O. ALS clinical trials review: 20 years of failure. Are we any closer to registering a new treatment? *Front. Aging Neurosci.* **9**, 1–11 (2017).
6. Longinetti, E. & Fang, F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: An update of recent literature. *Curr. Opin. Neurol.* **32**, 771–776 (2019).
7. Chiò, A. *et al.* A cross sectional study on determinants of quality of life in ALS. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **75**, 1597–1601 (2004).
8. Marin, B. *et al.* Variation in world wide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* **46**, 57–74 (2017).
9. Couratier, P. *et al.* Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Rev. Neurol. (Paris)*. **172**, 37–45 (2016).
10. MINISTERIO DE SANIDAD, C. Y. B. S. ABORDAJE DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (Estrategia en Enfermedades Neurodegenerativas del Sistema Nacional de Salud. 1–57 (2017).
11. Talbot, E. O., Malek, A. M. & Lacomis, D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 138 225–238 (Elsevier B.V., 2016).
12. Masrori, P. & Van Damme, P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* **27**, 1918–1929 (2020).
13. Al-Chalabi, A. & Hardiman, O. The epidemiology of ALS: A conspiracy of genes, environment and time. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 617–628 (2013).
14. Brooks, B. R. El escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **124**, 96–107 (1994).
15. Agosta, F. *et al.* The El Escorial criteria: Strengths and weaknesses. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **16**, 1–7 (2015).
16. Andersen, P. M. & Al-Chalabi, A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: What do we really know? *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 603–615 (2011).
17. Teyssou, E. *et al.* Novel UBQLN2 mutations linked to amyotrophic lateral sclerosis and atypical hereditary spastic paraplegia phenotype through defective HSP70-mediated proteolysis. *Neurobiol. Aging* **58**, 239.e11–239.e20 (2017).
18. Byrne, S. *et al.* Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **82**, 623–627 (2011).
19. Al-Chalabi, A. *et al.* The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica* vol. 124 339–352 (2012).
20. Fang, F., Ingre, C., Roos, P., Kamel, F. & Piehl, F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Epidemiol.* **7**, 181 (2015).
21. Boumédiène, F. *et al.* Contribution of geolocalisation to neuroepidemiological studies: Incidence of ALS and environmental factors in Limousin, France. *J. Neurol. Sci.* **309**, 115–122 (2011).
22. Belzil, V. V., Katzman, R. B. & Petrucelli, L. ALS and FTD: an epigenetic perspective. *Acta Neuropathol.* **132**, 487–502 (2016).
23. Talbot, K. Familial versus sporadic amyotrophic lateral sclerosis-a false dichotomy? *Brain* (2011) doi:10.1093/brain/awr296.
24. Brown, R. H. & Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **377**, 162–172 (2017).
25. Banks, C. J. & Andersen, J. L. Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications. *Redox Biol.* **26**, 101270 (2019).
26. Alrafiah, aziza rashed. From Mouse Models to Human Disease: An Approach for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *In Vivo (Brooklyn)*. **32**, 983–998 (2018).
27. Yamagishi, S. *et al.* An in vitro model for lewy body-like hyaline inclusion/astrocytic hyaline inclusion: Induction by ER stress with an ALS-linked SOD1 mutation. *PLoS One* **2**, (2007).
28. Smith, E. F., Shaw, P. J. & De Vos, K. J. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* vol. 710 (2019).
29. Sharma, A. *et al.* ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nat. Commun.* **7**, 10465 (2016).
30. Sun, Y. & Chakrabarty, A. Phase to Phase with TDP-43. *Biochemistry* **56**, 809–823 (2017).
31. Ratti, A. & Buratti, E. Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J. Neurochem.* **138**, 95–111 (2016).
32. Lutz, C. Mouse models of ALS: Past, present and future. *Brain Research* vol. 1693 1–10 (2018).
33. Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V. & Girdhar, A. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **12**, 1–36 (2019).
34. Ederle, H. & Dormann, D. TDP-43 and FUS en route from the nucleus to the cytoplasm. *FEBS Letters* vol. 591 1489–1507 (2017).
35. Winton, M. J. *et al.* Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J. Biol. Chem.* **283**, 13302–13309 (2008).
36. Picher-Martel, V., Valdmanis, P. N., Gould, P. V., Julien, J.-P. & Dupré, N. From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, 70 (2016).
37. van Blitterswijk, M. *et al.* Association between repeat sizes and clinical and pathological characteristics in carriers of C9orf72 repeat expansions (Xpansize-72): A cross-sectional cohort study. *Lancet Neurol.* **12**, 978–988 (2013).
38. Suh, E. *et al.* Semi-automated quantification of C9orf72 expansion size reveals inverse correlation between hexanucleotide repeat number and disease duration in frontotemporal degeneration. *Acta Neuropathol.* **130**, 363–372 (2015).
39. García-Redondo, A. *et al.* Analysis of the C9orf72 Gene in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in Spain and Different Populations Worldwide. *Hum. Mutat.* **34**, 79–82 (2013).
40. van der Zee, J. *et al.* A Pan-European Study of the C9orf72 Repeat Associated with FTLD: Geographic Prevalence, Genomic Instability, and Intermediate Repeats. *Hum. Mutat.* **34**, 363–373 (2013).
41. Morgan, S. & Orrell, R. W. Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Br. Med. Bull.* **119**, 87–97 (2016).
42. Deng, H. X. *et al.* Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* **477**, 211–215 (2011).
43. Wang, W. *et al.* The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. *Nat. Med.* **22**, 869–878 (2016).
44. Dupuis, L. & Echaniz-Laguna, A. Skeletal Muscle in Motor Neuron Diseases: Therapeutic Target and Delivery Route for Potential Treatments. *Curr. Drug Targets* **11**, 1250–1261 (2010).
45. Dupuis, L. *et al.* Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J.* **17**, 2091–2093 (2003).
46. El Oussini, H. *et al.* Serotonin 2B receptor slows disease progression and prevents degeneration of spinal cord mononuclear phagocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **131**, 465–480 (2016).
47. Echaniz-Laguna, A. *et al.* Muscular mitochondrial function in amyotrophic lateral sclerosis is progressively altered as the disease develops: A temporal study in man. *Exp. Neurol.* **198**, 25–30 (2006).
48. Da Cruz, S. *et al.* Elevated PGC-1 $\alpha$  Activity Sustains Mitochondrial Biogenesis and Muscle Function without Extending Survival in a Mouse Model of Inherited ALS. *Cell Metab.* **15**, 778–786 (2012).
49. Vande Velde, C., Miller, T. M., Cashman, N. R. & Cleveland, D. W. *Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria.* vol. 105 (2008).
50. Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E. & Robberecht, W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* vol. 1762 1068–1082 (2006).
51. Sasaki, S. & Iwata, M. Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 10–16 (2007).
52. Paloczi, J., Varga, Z. V., Hasko, G. & Pacher, P. Neuroprotection in Oxidative Stress-Related Neurodegenerative Diseases: Role of Endocannabinoid System Modulation. *Antioxid. Redox Signal.* **29**, 75–108 (2018).
53. Xiao, Y. *et al.* ROS-related mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of an ALS mouse model during the disease progression. *Pharmacol. Res.* **138**, 25–36 (2018).
54. Smith, R. G., Henry, Y. K., Mattson, M. P. & Appel, S. H. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **44**, 696–699 (1998).
55. Chang, Y. *et al.* Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS.

56. Shibata, N. *et al.* Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res.* **917**, 97–104 (2001).
57. Barber, S. C. & Shaw, P. J. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology and Medicine* vol. 48 629–641 (2010).
58. Andrus, P. K., Fleck, T. J., Gurney, M. E. & Hall, E. D. Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **71**, 2041–2048 (1998).
59. King, A. E., Woodhouse, A., Kirkcaldie, M. T. K. & Vickers, J. C. Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? *Exp. Neurol.* **275**, 162–171 (2016).
60. Do-Ha, D., Buskila, Y. & Ooi, L. Impairments in Motor Neurons, Interneurons and Astrocytes Contribute to Hyperexcitability in ALS: Underlying Mechanisms and Paths to Therapy. *Mol. Neurobiol.* **55**, 1410–1418 (2018).
61. Rothstein, J. D. *et al.* Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **28**, 18–25 (1990).
62. Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J. & Kuncl, R. W. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **38**, 73–84 (1995).
63. Pardo, A. C. *et al.* Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1G93A mice. *Exp. Neurol.* **201**, 120–130 (2006).
64. Zhang, W. *et al.* Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nat. Neurosci.* **19**, 557–559 (2016).
65. Pieri, M., Carunchio, I., Curcio, L., Mercuri, N. B. & Zona, C. Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **215**, 368–379 (2009).
66. Vanselow, B. K. & Keller, B. U. Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneuron disease. *J. Physiol.* **525**, 433–445 (2000).
67. Bilsland, L. & Greensmith, L. The Endocannabinoid System in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 2306–2316 (2008).
68. Jaiswal, M. K. Riluzole but not melatonin ameliorates acute motor neuron degeneration and moderately inhibits sod1-mediated excitotoxicity induced disrupted mitochondrial Ca<sup>2+</sup> signaling in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, 1–14 (2017).
69. Parone, P. A. *et al.* Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* **33**, 4657–4671 (2013).
70. Stoica, R. *et al.* ER&ndash;mitochondria associations are regulated by the VAPB&ndash;PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. (2014) doi:10.1038/ncomms4996.
71. Stoica, R. *et al.* ALS / FTD -associated FUS activates GSK -3 $\beta$  to disrupt the VAPB – PTPIP 51 interaction and ER –mitochondria associations. *EMBO Rep.* **17**, 1326–1342 (2016).
72. Kawahara, Y. *et al.* RNA editing and death of motor neurons. *Nature* **427**, 801–801 (2004).
73. Damme, P. Van *et al.* Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0705046104 (2007).
74. Bataveljić, D., Nikolić, L., Milosević, M., Todorović, N. & Andjus, P. R. Changes in the astrocytic aquaporin-4 and inwardly rectifying potassium channel expression in the brain of the amyotrophic lateral sclerosis SOD1<sup>G93A</sup> rat model. *Glia* **60**, 1991–2003 (2012).
75. Van Damme, P., Dewil, M., Robberecht, W. & Van Den Bosch, L. Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener. Dis.* **2**, 147–159 (2006).
76. Prinz, M. & Priller, J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat. Neurosci.* **20**, 136–144 (2017).
77. McCauley, M. E. & Baloh, R. H. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathologica* vol. 137 715–730 (2019).
78. Streit, W. J. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* **40**, 133–139 (2002).
79. Hanisch, U. K. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140–155 (2002).
80. Kreutzberg, G. W. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **19**, 312–318 (1996).
81. Weydt, P. & Möller, T. Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* **16**, 527–531 (2005).
82. Yamanaka, K. & Komine, O. The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neurosci. Res.* **126**, 31–38 (2018).
83. Yamanaka, K. *et al.* Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7594–7599 (2008).
84. Kia, A., McAvoy, K., Krishnamurthy, K., Trotti, D. & Pasinelli, P. Astrocytes expressing ALS-linked mutant FUS induce motor neuron death through release of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Glia* **66**, 1016–1033 (2018).
85. Filipi, T., Hermanova, Z., Tureckova, J., Vanatko, O. & Anderova, A. M. Glial Cells-The Strategic Targets in Amyotrophic Lateral Sclerosis Treatment. *J. Clin. Med.* **9**, 1–49 (2020).
86. Garaschuk, O. *Microglia*. vol. 2034 (Springer New York, 2019).
87. Tripathi, P. *et al.* Reactive Astrocytes Promote ALS-like Degeneration and Intracellular Protein Aggregation in Human Motor Neurons by Disrupting Autophagy through TGF- $\beta$ 1. *Stem Cell Reports* **9**, 667–680 (2017).
88. Nagai, M. *et al.* Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat. Neurosci.* **10**, 615–622 (2007).
89. Yiangou, Y. *et al.* COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol.* **6**, (2006).
90. Geloso, M. C. *et al.* The dual role of microglia in ALS: Mechanisms and therapeutic approaches. *Front. Aging Neurosci.* **9**, (2017).
91. Gandelman, M., Peluffo, H., Beckman, J. S., Cassina, P. & Barbeito, L. Extracellular ATP and the P2X7receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflammation* **7**, 1–9 (2010).
92. Ohsawa, K. *et al.* Involvement of P2X 4 and P2Y 12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia* **55**, 604–616 (2007).
93. Pryce, G. & Baker, D. Endocannabinoids in Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. in *Endocannabinoids* 213–231 (2015). doi:10.1007/978-3-319-20825-1\_7.
94. Blokhuis, A. M. *et al.* Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* **3**, 777–794 (2013).
95. Martinez-Vicente, M. Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **40**, 115–126 (2015).
96. Guo, F., Liu, X., Cai, H. & Le, W. Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy. *Brain Pathol.* **28**, 3–13 (2018).
97. Ghavami, S. *et al.* Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog. Neurobiol.* **112**, 24–49 (2014).
98. Morimoto, N. *et al.* Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res.* **1167**, 112–117 (2007).
99. Nedelsky, N. B., Todd, P. K. & Taylor, J. P. Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: Collaborators in neuroprotection. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* vol. 1782 691–699 (2008).
100. Sasaki, S. Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **70**, 349–359 (2011).
101. Brady, O. A., Meng, P., Zheng, Y., Mao, Y. & Hu, F. Regulation of TDP-43 aggregation by phosphorylation and p62/SQSTM1. *J. Neurochem.* **116**, 248–259 (2011).
102. Li, A., Zhang, X. & Le, W. Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy* **4**, 290–293 (2008).
103. Crippa, V. *et al.* The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3440–3456 (2010).
104. Droppelmann, C. A., Campos-Melo, D., Moszczynski, A. J., Amzil, H. & Strong, M. J. TDP-43 aggregation inside micronuclei reveals a potential mechanism for protein inclusion formation in ALS. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
105. Hintzsche, H. *et al.* Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **771**, 85–98 (2017).
106. Scotti, M. M. & Swanson, M. S. RNA mis-splicing in disease. *Nature Reviews Genetics* vol. 17 19–32 (2016).
107. Cooper-Knock, J. *et al.* C9ORF72 GGGGCC Expanded Repeats Produce Splicing Dysregulation which Correlates with Disease Severity in Amyotrophic Lateral Sclerosis. (2015) doi:10.1371/journal.pone.0127376.
108. Lepore, E., Casola, I., Dobrowolny, G. & Musarò, A. Neuromuscular Junction as an Entity of Nerve-Muscle Communication. *Cells* **8**, 906 (2019).
109. Wier, C. G. *et al.* Muscle contractility dysfunction precedes loss of motor unit connectivity in SOD1(G93A) mice. *Muscle and Nerve* **59**, 254–262 (2019).

110. Vock, V. M., Ponomareva, O. N. & Rimer, M. Evidence for muscle-dependent neuromuscular synaptic site determination in mammals. *J. Neurosci.* **28**, 3123–3130 (2008).
111. Yang, X. *et al.* Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron* **30**, 399–410 (2001).
112. Wong, M. & Martin, L. J. Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2284–2302 (2010).
113. Dupuis, L. & Loeffler, J.-P. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 341–346 (2009).
114. Loeffler, J.-P. P., Picchiarrelli, G., Dupuis, L. & Gonzalez De Aguilar, J.-L. L. The role of skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis. in *Brain Pathology* vol. 26 227–236 (Blackwell Publishing Ltd, 2016).
115. Halter, B. *et al.* Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 915–923 (2010).
116. Van Damme, P., Robberecht, W. & Van Den Bosch, L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: Progress and possibilities. *DMM Disease Models and Mechanisms* vol. 10 537–549 (2017).
117. Liachko, N. F., Guthrie, C. R. & Kraemer, B. C. Neurobiology of Disease Phosphorylation Promotes Neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* Model of TDP-43 Proteinopathy. (2010) doi:10.1523/JNEUROSCI.2911-10.2010.
118. Quan Wong, S. *et al.*  $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -phenylsuccinimide ameliorates neurodegeneration in a *C. elegans* model of TDP-43 proteinopathy. *Neurobiol. Dis.* **118**, 40–54 (2018).
119. Liachko, N. F. *et al.* The phosphatase calcineurin regulates pathological TDP-43 phosphorylation HHS Public Access. *Acta Neuropathol* **132**, 545–561 (2016).
120. Anderson, E. N. *et al.* Traumatic injury induces stress granule formation and enhances motor dysfunctions in ALS/FTD models. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 1366–1381 (2018).
121. Krug, L. *et al.* Retrotransposon activation contributes to neurodegeneration in a *Drosophila* TDP-43 model of ALS. *PLoS Genet.* **13**, (2017).
122. Markmiller, S. *et al.* Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules. *Cell* **172**, 590–604.e13 (2018).
123. Svahn, A. J. *et al.* Nucleo-cytoplasmic transport of TDP-43 studied in real time: impaired microglia function leads to axonal spreading of TDP-43 in degenerating motor neurons. *Acta Neuropathol.* **136**, 445–459 (2018).
124. Maccioni, R. *et al.* Standardized phytotherapeutic extracts rescue anomalous locomotion and electrophysiological responses of TDP-43 *Drosophila melanogaster* model of ALS. *Sci. Rep.* **8**, 16002 (2018).
125. Coates, J. R. & Wininger, F. A. Canine degenerative myelopathy. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* vol. 40 929–950 (2010).
126. Fernandez-Trapero, M. *et al.* Upregulation of CB2 receptors in reactive astrocytes in canine degenerative myelopathy, a disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *DMM Dis. Model. Mech.* **10**, 551–558 (2017).
127. Nardone, R. *et al.* Canine degenerative myelopathy: A model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Zoology* vol. 119 64–73 (2016).
128. Golubczyk, D. *et al.* The Role of Glia in Canine Degenerative Myelopathy: Relevance to Human Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol. Neurobiol.* **56**, 5740–5748 (2019).
129. Lindblad-Toh, K. *et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* **438**, 803–819 (2005).
130. Sándor, S. & Kubinyi, E. *et al.* Genetic Pathways of Aging and Their Relevance in the Dog as a Natural Model of Human Aging. **10**, (2019).
131. Hoffman, J. M., Creevy, K. E., Franks, A., O'Neill, D. G. & Promislow, D. E. L. The companion dog as a model for human aging and mortality. *Aging Cell* **17**, (2018).
132. McCombe, P. A. & Henderson, R. D. Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gender Medicine* vol. 7 557–570 (2010).
133. Schurman, L. D., Lu, D., Kendall, D. A., Howlett, A. C. & Lichtman, A. H. Molecular Mechanism and Cannabinoid Pharmacology. in (2019). doi:10.1007/164\_2019\_298.
134. Pertwee, R. G. *handbook of cannabis. Handbook of Cannabis* (Oxford University Press, 2014).
135. Mechoulam, R. & Gaoni, Y. Recent Advances in the Chemistry of Hashish. in *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / Progrès dans la Chimie des Substances Organiques Naturelles* vol. 25 175–213 (Springer Vienna, 1967).
136. Mechoulam, R. & Parker, L. A. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu. Rev. Psychol.* **64**, 21–47 (2013).
137. Gaoni, Y. & Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1646–1647 (1964).
138. Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S. & Howlett, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **34**, 605–613 (1988).
139. Herkenham, M. Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: An in vitro technique using slide-mounted tissue sections. in *NIDA Research Monograph Series* vol. 7 129–145 (1991).
140. Lynn, A. B. & Herkenham, M. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: Implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 1612–1623 (1994).
141. Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. & Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561–564 (1990).
142. Munro, S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61–65 (1993).
143. Devane, W. *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (80-. )*. **258**, 1946–1949 (1992).
144. Mechoulam, R. *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 83–90 (1995).
145. Hanuš, L., Gopher, A., Almog, S. & Mechoulam, R. Two New Unsaturated Fatty Acid Ethanolamides in Brain That Bind to the Cannabinoid Receptor. *J. Med. Chem.* **36**, 3032–3034 (1993).
146. Cravatt, B. F. *et al.* Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* **384**, 83–87 (1996).
147. Dinh, T. P. *et al.* Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10819–10824 (2002).
148. Howlett, A. C. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68–69**, 619–631 (2002).
149. Fernández-Ruiz, J., Sagredo, O. & de Lago, E. Chapter 2. Phytocannabinoids Versus Endocannabinoids. A Modern View of the Endocannabinoid System . 10–47 (2020) doi:10.1039/9781839160752-00010.
150. Hudson, B. D., Hébert, T. E. & M. Kelly, M. E. Ligand- and Heterodimer-Directed Signaling of the CB 1 Cannabinoid Receptor. *Mol. Pharmacol.* **77**, 1–9 (2010).
151. Callén, L. *et al.* Cannabinoid Receptors CB 1 and CB 2 Form Functional Heteromers in Brain. *J. Biol. Chem.* **287**, 20851–20865 (2012).
152. Hoehe, M. R. *et al.* Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol.* **3**, 880–885 (1991).
153. Howlett, A. C. *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **54**, 161–202 (2002).
154. BOUABOULA, M. *et al.* Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur. J. Biochem.* **214**, 173–180 (1993).
155. Galiegue, S. *et al.* Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. *Eur. J. Biochem.* **232**, 54–61 (1995).
156. Ishac, E. J. N. *et al.* Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 2023–2028 (1996).
157. Pertwee, R. G. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* vol. 48 859–867 (2001).
158. Mukhopadhyay, S., Shim, J. Y., Assi, A. A., Norford, D. & Howlett, A. C. CB1 cannabinoid receptor-G protein association: A possible mechanism for differential signaling. in *Chemistry and Physics of Lipids* vol. 121 91–109 (Elsevier, 2002).
159. Bidaut-Russell, M., Devane, W. A. & Howlett, A. C. Cannabinoid Receptors and Modulation of Cyclic AMP Accumulation in the Rat Brain. *J. Neurochem.* **55**, 21–26 (1990).
160. Howlett, A. C. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase: Relative activity of constituents and metabolites of marihuana. *Neuropharmacology* **26**, 507–512 (1987).
161. Szabo, B. & Schlicker, E. Effects of Cannabinoids on Neurotransmission. in *Cannabinoids* 327–365 (Springer-Verlag, 2005). doi:10.1007/3-540-26573-2\_11.

162. Djeungoue-Petga, M. A. & Hebert-Chatelain, E. Linking Mitochondria and Synaptic Transmission: The CB1 Receptor. *BioEssays* **39**, 1–11 (2017).
163. Oliveira da Cruz, J. F., Robin, L. M., Drago, F., Marsicano, G. & Metna-Laurent, M. Astroglial type-1 cannabinoid receptor (CB1): A new player in the tripartite synapse. *Neuroscience* **323**, 35–42 (2016).
164. Navarrete, M. & Araque, A. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* **68**, 113–126 (2010).
165. Molina-Holgado, E. *et al.* Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: Involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J. Neurosci.* **22**, 9742–9753 (2002).
166. Cabral, G. A., Harmon, K. N. & Carlisle, S. J. Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: Evidence for cb1 receptor participation. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 493 207–214 (Springer, Boston, MA, 2001).
167. Köfalvi, A. *et al.* Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: A combined immunochemical and pharmacological analysis. *J. Neurosci.* **25**, 2874–2884 (2005).
168. Ma, L. *et al.* Mitochondrial CB1 receptor is involved in ACEA-induced protective effects on neurons and mitochondrial functions. *Sci. Rep.* **5**, 12440 (2015).
169. Melser, S. *et al.* Functional Analysis of Mitochondrial CB1 Cannabinoid Receptors (mtCB1) in the Brain. in *Methods in Enzymology* vol. 593 143–174 (Academic Press Inc., 2017).
170. Ameri, A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* **58**, 315–348 (1999).
171. Kaur, R., R. Ambwani, S. & Singh, S. Endocannabinoid System: A Multi-Facet Therapeutic Target. *Curr. Clin. Pharmacol.* **11**, 110–117 (2016).
172. Pacher, P., Bátkai, S. & Kunos, G. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* **58**, 389–462 (2006).
173. Moreira, F. A. & Lutz, B. The endocannabinoid system: Emotion, learning and addiction. *Addict. Biol.* **13**, 196–212 (2008).
174. Karsak, M. *et al.* Cannabinoid receptor type 2 gene is associated with human osteoporosis. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3389–3396 (2005).
175. Begg, M. *et al.* Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol. Ther.* **106**, 133–145 (2005).
176. Atwood, B. K. & MacKie, K. CB 2: A cannabinoid receptor with an identity crisis. *British Journal of Pharmacology* vol. 160 467–479 (2010).
177. Atwood, B. K., Straiker, A. & MacKie, K. CB2 cannabinoid receptors inhibit synaptic transmission when expressed in cultured autaptic neurons. *Neuropharmacology* **63**, 514–523 (2012).
178. Marchalant, Y., Brownjohn, P. W., Bonnet, A., Kleffmann, T. & Ashton, J. C. Validating Antibodies to the Cannabinoid CB2 Receptor: Antibody Sensitivity Is Not Evidence of Antibody Specificity. *J. Histochem. Cytochem.* **62**, 395–404 (2014).
179. Zoratti, C., Kipmen-Korgun, D., Osibow, K., Malli, R. & Graier, W. F. Anandamide initiates Ca<sup>2+</sup> signaling via CB 2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 1351–1362 (2003).
180. Bouchard, J. F., Lépicier, P. & Lamontagne, D. Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci.* **72**, 1859–1870 (2003).
181. Joyeux, M. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc. Res.* **55**, 619–625 (2002).
182. Roche, R. *et al.* Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem. Cell Biol.* **126**, 177–187 (2006).
183. Duncan, M. *et al.* Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G78 (2008).
184. Espejo-Porras, F. *et al.* Changes in the endocannabinoid signaling system in CNS structures of TDP-43 transgenic mice: relevance for a neuroprotective therapy in TDP-43-related disorders. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **10**, 233–244 (2015).
185. Benito, C. *et al.* Cannabinoid CB2 Receptors and Fatty Acid Amide Hydrolase Are Selectively Overexpressed in Neuritic Plaque-Associated Glia in Alzheimer's Disease Brains. *J. Neurosci.* **23**, 11136–11141 (2003).
186. Racz, I. *et al.* Crucial Role of CB2 Cannabinoid Receptor in the Regulation of Central Immune Responses during Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* **28**, 12125–12135 (2008).
187. García-Gutiérrez, M. S. & Manzanares, J. Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J. Psychopharmacol.* **25**, 111–120 (2011).
188. Xi, Z. X. *et al.* Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat. Neurosci.* **14**, 1160–1168 (2011).
189. Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J. & de Lago, E. Analysis of endocannabinoid receptors and enzymes in the post-mortem motor cortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **19**, 377–386 (2018).
190. Patel, H. J. *et al.* Inhibition of guinea-pig and human sensory nerve activity and the cough reflex in guinea-pigs by cannabinoid (CB 2) receptor activation. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 261–268 (2003).
191. García-Gutiérrez, M. S. *et al.* Alterations in Gene and Protein Expression of Cannabinoid CB 2 and GPR55 Receptors in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Suicide Victims. *Neurotherapeutics* **15**, 796–806 (2018).
192. Li, Y. & Kim, J. Neuronal expression of CB2 cannabinoid receptor mRNAs in the mouse hippocampus. *Neuroscience* **311**, 253–267 (2015).
193. Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gu, S. & Liu, Q. R. CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: Beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *Journal of Psychopharmacology* vol. 26 92–103 (2012).
194. Turcotte, C., Blanchet, M. R., Laviolette, M. & Flamand, N. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 4449–4470 (2016).
195. Liu, Q.-R. *et al.* Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes. Brain. Behav.* **8**, 519–30 (2009).
196. Pacher, P. & Mechoulam, R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog. Lipid Res.* **50**, 193–211 (2011).
197. Stumpf, A. *et al.* Cannabinoid type 2 receptors mediate a cell type-specific self-inhibition in cortical neurons. *Neuropharmacology* **139**, 217–225 (2018).
198. Jordan, C. J. & Xi, Z.-X. Progress in brain cannabinoid CB2 receptor research: From genes to behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **98**, 208–220 (2019).
199. Ma, Z. *et al.* Mechanisms of cannabinoid CB2 receptor-mediated reduction of dopamine neuronal excitability in mouse ventral tegmental area. *EBioMedicine* **42**, 225–237 (2019).
200. Palazuelos, J. *et al.* Non-psychoactive CB 2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* **20**, 2405–2407 (2006).
201. Ishiguro, H. *et al.* Cannabinoid CB2 receptor gene and environmental interaction in the development of psychiatric disorders. *Molecules* **23**, (2018).
202. Leinwand, K. L. *et al.* Cannabinoid Receptor-2 Ameliorates Inflammation in Murine Model of Crohn's Disease. *J. Crohns. Colitis* **11**, 1369–1380 (2017).
203. Cabral, G. A., Raborn, E. S., Griffin, L., Dennis, J. & Marciano-Cabral, F. CB 2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br. J. Pharmacol.* **153**, 240–251 (2008).
204. Oka, S. *et al.* Involvement of the Cannabinoid CB2 Receptor and Its Endogenous Ligand 2-Arachidonoylglycerol in Oxazolone-Induced Contact Dermatitis in Mice. *J. Immunol.* **177**, 8796–8805 (2006).
205. García, M. C., Cinquina, V., Palomo-Garo, C., Rábano, A. & Fernández-Ruiz, J. Identification of CB2 receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **587**, 1–4 (2015).
206. Rodríguez-Cueto, C. *et al.* Changes in CB1 and CB2 receptors in the post-mortem cerebellum of humans affected by spinocerebellar ataxias. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 1472–1489 (2014).
207. Fride, E. *et al.* Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB1 receptor knockout mice: Evidence for a 'CB3' receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **461**, 27–34 (2003).
208. Pacher, P., Kogan, N. M. & Mechoulam, R. Beyond THC and Endocannabinoids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **60**, 637–659 (2020).
209. Johns, D. G. *et al.* The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 825–831 (2007).
210. McHugh, D., Page, J., Dunn, E. & Bradshaw, H. B. Δ9-Tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2414–2424 (2012).
211. Sylantsev, S., Jensen, T. P., Ross, R. A. & Rusakov, D. A. Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 5193–5198 (2013).

212. Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S. & Sugiura, T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 928–934 (2007).
213. Ryberg, E. *et al.* The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 1092–1101 (2007).
214. Lauckner, J. E. *et al.* GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 2699–2704 (2008).
215. Kohno, M. *et al.* Identification of N-arachidonylethanolamide as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 827–832 (2006).
216. Syed, S. K. *et al.* Regulation of GPR119 receptor activity with endocannabinoid-like lipids. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **303**, E1469–78 (2012).
217. Ross, R. A. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 30 156–163 (2009).
218. Sharir, H. & Abood, M. E. Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 126 301–313 (2010).
219. Alavi, M. S., Shamsizadeh, A., Azhdari-Zarmehri, H. & Roohbakhsh, A. Orphan G protein-coupled receptors: The role in CNS disorders. *Biomed. Pharmacother.* **98**, 222–232 (2018).
220. Laun, A. S., Shrader, S. H. & Song, Z.-H. Novel inverse agonists for the orphan G protein-coupled receptor 6. *Heliyon* **4**, e00933 (2018).
221. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP Channels TRP: Transient Receptor Potential. *Annu Rev Biochem.* **76**, 387–417 (2007).
222. Oakes, M., Law, W. J. & Komuniecki, R. Cannabinoids Stimulate the TRP Channel-Dependent Release of Both Serotonin and Dopamine to Modulate Behavior in *C. elegans*. *J. Neurosci.* **39**, 4142–4152 (2019).
223. Caterina, M. J. & Julius, D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 487–517 (2001).
224. Maione, S. *et al.* Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 584–596 (2011).
225. de Petrocellis, L. *et al.* Cannabinoid actions at TRPV channels: Effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol.* **204**, 255–266 (2012).
226. De Petrocellis, L. *et al.* Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 1479–1494 (2011).
227. Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Tagliatela-Scafati, O. & Appendino, G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat. Prod. Rep.* **33**, 1357–1392 (2016).
228. Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Fezza, F., Ligresti, A. & Bisogno, T. Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **66**, 377–391 (2002).
229. Stienstra, R., Duval, C., Müller, M. & Kersten, S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res.* **2007**, (2007).
230. Sun, Y. & Bennett, A. Cannabinoids: A New Group of Agonists of PPARs. (2007) doi:10.1155/2007/23513.
231. Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S., Lin, E. & Piomelli, D. Oleylethanolamide, an endogenous PPAR-gamma agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*, 48(8 SPEC. ISS.), 1147–1153. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.02.013>nd hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology* **48**, 1147–1153 (2005).
232. Guzmán, M. *et al.* Oleylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ). *J. Biol. Chem.* **279**, 27849–27854 (2004).
233. Liu, J., Li, H., Burstein, S. H., Zurier, R. B. & Chen, J. D. Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  by synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Mol. Pharmacol.* **63**, 983–992 (2003).
234. O'Sullivan, S. E. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 1899–1910 (2016).
235. O'Sullivan, S. E. Cannabinoids go nuclear: Evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 576–582 (2007).
236. Lengqvist, J. *et al.* Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor  $\alpha$  ligand-binding domain. *Molecular and Cellular Proteomics* vol. 3 692–703 (2004).
237. Burstein, S. H., Rossetti, R. G., Yagen, B. & Zurier, R. B. Oxidative metabolism of anandamide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **61**, 29–41 (2000).
238. Warden, A. *et al.* Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain. *Sci. Rep.* **6**, 27618 (2016).
239. Mechoulam, R., Hanuš, L. O., Pertwee, R. & Howlett, A. C. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 757–764 (2014).
240. Rock, E. M. *et al.* Evaluation of repeated or acute treatment with cannabidiol (CBD), cannabidiolic acid (CBDA) or CBDA methyl ester (HU-580) on nausea and/or vomiting in rats and shrews. *Psychopharmacology (Berl.)* **237**, 2621–2631 (2020).
241. Di Marzo, V. & Fontana, A. Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'Killing two birds with one stone'. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* **53**, 1–11 (1995).
242. Felder, C. C. *et al.* Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7656–7660 (1993).
243. Felder, C. C. *et al.* Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* **393**, 231–235 (1996).
244. Gonsiorek, W. *et al.* Endocannabinoid 2-arachidonylethanolamide is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: Antagonism by anandamide. *Mol. Pharmacol.* **57**, 1045–1050 (2000).
245. Zygmunt, P. M. *et al.* Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452–457 (1999).
246. Alger, B. E. Endocannabinoids at the synapse a decade after the dies mirabilis (29 March 2001): what we still do not know. *J. Physiol.* **590**, 2203–2212 (2012).
247. Hill, J. D., Zuluaga-Ramirez, V., Gajghate, S., Winfield, M. & Persidsky, Y. Activation of GPR55 increases neural stem cell proliferation and promotes early adult hippocampal neurogenesis. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 3407–3421 (2018).
248. Huang, L. *et al.* Anandamide exerts its antiproliferative actions on cholangiocarcinoma by activation of the GPR55 receptor. *Lab. Investig.* **91**, 1007–1017 (2011).
249. Bisogno, T. *et al.* Brain regional distribution of endocannabinoids: Implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 377–380 (1999).
250. Zou, S. & Kumar, U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
251. Capasso, R. *et al.* Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 945–950 (2001).
252. Conti, S., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D. & Giagnoni, G. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 181–187 (2002).
253. Ben-Shabat, S. *et al.* An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonylethanolamide cannabinoid activity. *Eur. J. Pharmacol.* **353**, 23–31 (1998).
254. Hassing, H. A. *et al.* Oral 2-oleyl glyceryl ether improves glucose tolerance in mice through the GPR119 receptor. *BioFactors* **42**, 665–673 (2016).
255. Lu, L., Williams, G. & Doherty, P. 2-Linoleoylglycerol Is a Partial Agonist of the Human Cannabinoid Type 1 Receptor that Can Suppress 2-Arachidonylethanolamide and Anandamide Activity. *Cannabis Cannabinoid Res.* **4**, 231–239 (2019).
256. Oddi, S. *et al.* Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 840–850 (2008).
257. Hillard, C. J. & Jarrahian, A. Cellular accumulation of anandamide: Consensus and controversy. *British Journal of Pharmacology* vol. 140 802–808 (2003).
258. Kaczocha, M., Glaser, S. T., Chae, J., Brown, D. A. & Deutsch, D. G. Lipid droplets are novel sites of N-acyl ethanolamine inactivation by fatty acid amide hydrolase-2. *J. Biol. Chem.* **285**, 2796–2806 (2010).
259. Lu, H. C. & MacKie, K. An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biological Psychiatry* vol. 79 516–525 (2016).
260. Caille, S., Alvarez-Jaimes, L., Polis, I., Stouffer, D. G. & Parsons, L. H. Specific Alterations of Extracellular Endocannabinoid Levels in the Nucleus Accumbens by Ethanol, Heroin, and Cocaine Self-Administration. *J. Neurosci.* **27**, 3695–3702 (2007).
261. Nomura, D. K. *et al.* Endocannabinoid Hydrolysis Generates Brain Prostaglandins That Promote Neuroinflammation. *Science (80-. )* **334**, 809–813 (2011).
262. Schmid, P. C., Reddy, P. V., Natarajan, V. & Schmid, H. H. Metabolism of N-acyl ethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. *J. Biol. Chem.* **258**, 9302–9306 (1983).



263. Liu, J. *et al.* A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 13345–13350 (2006).
264. Simon, G. M. & Cravatt, B. F. Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol. Biosyst.* **6**, 1411 (2010).
265. Tsuboi, K. *et al.* Biosynthetic Pathways of Bioactive N-Acylethanolamines in Brain. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **12**, 7–16 (2013).
266. Yoshida, T. *et al.* Localization of diacylglycerol lipase- $\alpha$  around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J. Neurosci.* **26**, 4740–4751 (2006).
267. Maccarrone, M. *et al.* Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 277–296 (2015).
268. McKinney, M. K. & Gravatt, B. F. Structure-based design of a FAAH variant that discriminates between the N-acyl ethanolamine and taurine families of signaling lipids. *Biochemistry* **45**, 9016–9022 (2006).
269. Fowler, C. J., Doherty, P. & Alexander, S. P. H. *Endocannabinoid Turnover. Advances in Pharmacology* vol. 80 (Elsevier Inc., 2017).
270. Fezza, F. *et al.* Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules* **19**, 17078–17106 (2014).
271. Tsuboi, K. *et al.* Molecular Characterization of N-Acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase, a Novel Member of the Choloylglycine Hydrolase Family with Structural and Functional Similarity to Acid Ceramidase\*. (2005) doi:10.1074/jbc.M413473200.
272. Luchicchi, A. *et al.* Effects of fatty acid amide hydrolase inhibition on neuronal responses to nicotine, cocaine and morphine in the nucleus accumbens shell and ventral tegmental area: involvement of PPAR- $\alpha$  nuclear receptors. *Addict Biol* **15**, 277–288 (2010).
273. Blankman, J. L., Simon, G. M. & Cravatt, B. F. A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Chem Biol* **14**, 1347–1356 (2007).
274. Saario, S. M. *et al.* URB754 has no effect on the hydrolysis or signaling capacity of 2-AG in the rat brain. *Chem. Biol.* **13**, 811–4 (2006).
275. Thomas, G. *et al.* The Serine Hydrolase ABHD6 Is a Critical Regulator of the Metabolic Syndrome. *Cell Rep.* **5**, 508–520 (2013).
276. Gatta, L. *et al.* Discovery of prostamide F2 $\alpha$  and its role in inflammatory pain and dorsal horn nociceptive neuron hyperexcitability. *PLoS One* **7**, e31111 (2012).
277. Alhouayek, M. & Muccioli, G. G. COX-2-derived endocannabinoid metabolites as novel inflammatory mediators. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 284–292 (2014).
278. Yang, R. *et al.* Decoding functional metabolomics with docosahexaenoyl ethanolamide (DHEA) identifies novel bioactive signals. *J. Biol. Chem.* **286**, 31532–31541 (2011).
279. Fowler, C. J. Transport of endocannabinoids across the plasma membrane and within the cell. *FEBS Journal* vol. 280 1895–1904 (2013).
280. Howlett, A. C., Rezk, B. M., Bradshaw, H., Starowicz, K. & Deutsch, D. G. A Personal Retrospective: Elevating Anandamide (AEA) by Targeting Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) and the Fatty Acid Binding Proteins (FABPs). *Front. Pharmacol.* / *www.frontiersin.org* **7**, (2016).
281. Di Marzo, V. *et al.* Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **372**, 686–691 (1994).
282. Sanson, B. *et al.* Crystallographic study of FABP5 as an intracellular endocannabinoid transporter. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **70**, 290–298 (2014).
283. Di Marzo, V., Ligresti, A., Morera, E., Nalli, M. & Ortar, G. The anandamide membrane transporter. Structure–activity relationships of anandamide and oleoylethanolamine analogs with phenyl rings in the polar head group region. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 5161–5169 (2004).
284. Kaczocha, M. *et al.* Fatty acid binding protein deletion suppresses inflammatory pain through endocannabinoid/N-acylethanolamine-dependent mechanisms. *Mol. Pain* **11**, s12990-015–0056 (2015).
285. Mackie, K. Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. in *Life Sciences* vol. 77 1667–1673 (Pergamon, 2005).
286. Melvin, L. S., Johnson, M. R., Harbert, C. A., Milne, G. M. & Weissman, A. A Cannabinoid Derived Prototypal Analgesic. *J. Med. Chem.* **27**, 67–71 (1984).
287. D’Ambra, T. E. *et al.* Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.* **35**, 124–35 (1992).
288. Richter, A. & Löscher, W. (+)-WIN 55,212-2, a novel cannabinoid receptor agonist, exerts antidystonic effects in mutant dystonic hamsters. *Eur. J. Pharmacol.* **264**, 371–377 (1994).
289. Prather, P. L., Martin, N. A., Breivogel, C. S. & Childers, S. R. Activation of cannabinoid receptors in rat brain by WIN 55212-2 produces coupling to multiple G protein  $\alpha$ -subunits with different potencies. *Mol. Pharmacol.* **57**, 1000–1010 (2000).
290. Abadji, V. *et al.* (R)-Methanandamide: A Chiral Novel Anandamide Possessing Higher Potency and Metabolic Stability. *J. Med. Chem.* **37**, 1889–1893 (1994).
291. Hillard, C. J. *et al.* Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1427–1433 (1999).
292. Di Marzo, V. *et al.* Highly selective CB1cannabinoid receptor ligands and novel CB1/VR1vanilloid receptor  $\alpha$ 1hybrid $\alpha$  ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 444–451 (2001).
293. Jarrahan, A., Manna, S., Edgemond, W. S., Campbell, W. B. & Hillard, C. J. Structure-activity relationships among N-arachidonylethanolamine (anandamide) head group analogues for the anandamide transporter. *J. Neurochem.* **74**, 2597–2606 (2000).
294. Rinaldi-Carmona, M. *et al.* SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* **350**, 240–244 (1994).
295. Rinaldi-Carmona, M. *et al.* SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**, 644–650 (1998).
296. Pertwee, R. G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* **6**, 635–64 (1999).
297. Landsman, R. S. *et al.* AM630 is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Life Sci.* **62**, PL109-13 (1998).
298. Hosohata, Y. *et al.* AM630 antagonism of cannabinoid-stimulated [35S]GTP $\gamma$ S binding in the mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* **321**, (1997).
299. Bolognini, D., Cascio, M. G., Parolaro, D. & Pertwee, R. G. AM630 behaves as a protean ligand at the human cannabinoid CB 2 receptor. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2561–2574 (2012).
300. Mock, E. D. *et al.* Discovery of a NAPE-PLD inhibitor that modulates emotional behavior in mice. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 667–675 (2020).
301. Wilkerson, J. L. *et al.* Investigation of diacylglycerol lipase alpha inhibition in the mouse lipopolysaccharide inflammatory pain model[s]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **363**, 394–401 (2017).
302. Hsu, K.-L. *et al.* Optimization and characterization of a triazole urea inhibitor for diacylglycerol lipase beta (DAGL- $\beta$ ). *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program* (National Center for Biotechnology Information (US), 2010).
303. Magrioti, V., Naxakis, G., Hadjipavlou-Litina, D., Makriyannis, A. & Kokotos, G. A novel monoacylglycerol lipase inhibitor with analgesic and anti-inflammatory activity. (2008) doi:10.1016/j.bmcl.2008.09.039.
304. Deutsch, D. G. & Makriyannis, A. Inhibitors of anandamide breakdown. *NIDA Res. Monogr.* **173**, 65–84 (1997).
305. Di Marzo, V. The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacological Research* vol. 60 77–84 (2009).
306. Saario, S. M. *et al.* URB754 Has No Effect on the Hydrolysis or Signaling Capacity of 2-AG in the Rat Brain. *Chem. Biol.* **13**, 811–814 (2006).
307. Vandevoorde, S. *et al.* Lack of selectivity of URB602 for 2-oleoylglycerol compared to anandamide hydrolysis in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 186–191 (2007).
308. Glaser, S. T., Kaczocha, M. & Deutsch, D. G. Anandamide transport: A critical review. *Life Sci.* **77**, 1584–1604 (2005).
309. Berger, W. T. *et al.* Targeting Fatty Acid Binding Protein (FABP) Anandamide Transporters - A Novel Strategy for Development of Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Drugs. *PLoS One* **7**, e50968 (2012).
310. Elmes, M. W. *et al.* Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). *J. Biol. Chem.* **290**, 8711–8721 (2015).
311. Navarro, G. *et al.* Targeting cannabinoid CB2 receptors in the central nervous system. Medicinal chemistry approaches with focus on neurodegenerative disorders. *Frontiers in Neuroscience* vol. 10 (2016).
312. Morales, P., Goya, P., Jagerovic, N. & Hernandez-Folgado, L. Allosteric Modulators of the CB 1 Cannabinoid Receptor: A Structural Update Review. *Cannabis Cannabinoid Res.* **1**, 22–30 (2016).
313. Morales, P., Goya, P. & Jagerovic, N. Emerging strategies targeting CB2 cannabinoid receptor: Biased agonism and allosterism. *Biochemical Pharmacology* vol. 157 8–17

- (2018).
314. Martínez-Pinilla, E. *et al.* Binding and signaling studies disclose a potential allosteric site for cannabidiol in cannabinoid CB2 receptors. *Front. Pharmacol.* **8**, 1–10 (2017).
  315. Horswill, J. G. *et al.* PSNCBAM-1, a novel allosteric antagonist at cannabinoid CB 1 receptors with hypophagic effects in rats. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 805–814 (2007).
  316. McPartland, J. M., Duncan, M., Di Marzo, V. & Pertwee, R. G. Are cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 737–753 (2015).
  317. Felder, C. C. *et al.* Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.* **48**, 443–450 (1995).
  318. Bayewitch, M. *et al.* (-)- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **271**, 9902–9905 (1996).
  319. Iwamura, H., Suzuki, H., Ueda, Y., Kaya, T. & Inaba, T. In vitro and in vivo pharmacological characterization of JTE-907, a novel selective ligand for cannabinoid CB2 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 420–425 (2001).
  320. Govaerts, S. J., Hermans, E. & Lambert, D. M. Comparison of cannabinoid ligands affinities and efficacies in murine tissues and in transfected cells expressing human recombinant cannabinoid receptors. *Eur. J. Pharm. Sci.* **23**, 233–243 (2004).
  321. Pertwee, R. Receptors and Channels Targeted by Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists and Antagonists. *Curr. Med. Chem.* **17**, 1360–1381 (2010).
  322. O'Sullivan, S. E., Tarling, E. J., Bennett, A. J., Kendall, D. A. & Randall, M. D. Novel time-dependent vascular actions of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 824–831 (2005).
  323. De Petrocellis, L. *et al.* Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**, 1007–1015 (2008).
  324. De Petrocellis, L. & Di Marzo, V. Non-CB1, Non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: Focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **5**, 103–121 (2010).
  325. Evans, F. Cannabinoids: The Separation of Central from Peripheral Effects on a Structural Basis. *Planta Med.* **57**, S60–S67 (1991).
  326. Yamaori, S., Kushihara, M., Yamamoto, I. & Watanabe, K. Characterization of major phytocannabinoids, cannabidiol and cannabinol, as isoform-selective and potent inhibitors of human CYP1 enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 1691–1698 (2010).
  327. Yamaori, S., Maeda, C., Yamamoto, I. & Watanabe, K. Differential inhibition of human cytochrome P450 2A6 and 2B6 by major phytocannabinoids. *Forensic Toxicol.* **29**, 117–124 (2011).
  328. Yamaori, S., Ebisawa, J., Okushima, Y., Yamamoto, I. & Watanabe, K. Potent inhibition of human cytochrome P450 3A isoforms by cannabidiol: Role of phenolic hydroxyl groups in the resorcinol moiety. *Life Sci.* **88**, 730–736 (2011).
  329. Yamaori, S., Okamoto, Y., Yamamoto, I. & Watanabe, K. Cannabidiol, a Major Phytocannabinoid, As a Potent Atypical Inhibitor for CYP2D6. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 2049–2056 (2011).
  330. Rakhshan, F., Day, T. A., Blakely, R. D. & Barker, E. L. Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 960–967 (2000).
  331. Pertwee, R. G. The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids. *Pharmacol. Ther.* **36**, 189–261 (1988).
  332. Costa, B. On the pharmacological properties of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC). *Chem. Biodivers.* **4**, 1664–1677 (2007).
  333. Bolognini, D. *et al.* The plant cannabinoid  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol can decrease signs of inflammation and inflammatory pain in mice. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 677–687 (2010).
  334. Bolognini, D., Cascio, M. G., Parolaro, D., Pertwee, R. G. & Pertwee, R. G. Themed Section: Cannabinoids in Biology and Medicine, Part II AM630 behaves as a protean ligand at the human cannabinoid CB 2 receptor model of agonism and inverse agonism; protean ligand LINKED ARTICLES. (2011) doi:10.1111/bph.2012.165.issue-8.
  335. Thomas, A. *et al.* Evidence that the plant cannabinoid  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol is a cannabinoid CB 1 and CB 2 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **146**, 917–926 (2005).
  336. Pertwee, R. G. *et al.* The psychoactive plant cannabinoid,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, is antagonized by  $\Delta^8$ - and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in mice in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 586–594 (2009).
  337. Hill, A. J. *et al.*  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol suppresses in vitro epileptiform and in vivo seizure activity in adult rats. *Epilepsia* **51**, 1522–1532 (2010).
  338. Anavi-Goffer, S. *et al.* Modulation of L- $\alpha$ -lysophosphatidylinositol/GPR55 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling by cannabinoids. *J. Biol. Chem.* **287**, 91–104 (2012).
  339. Muller, C., Morales, P. & Reggio, P. H. Cannabinoid ligands targeting TRP channels. *Frontiers in Molecular Neuroscience* vol. 11 (2019).
  340. Cascio, M. G., Zamberletti, E., Marini, P., Parolaro, D. & Pertwee, R. G. The phytocannabinoid,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, can act through 5-HT 1 A receptors to produce antipsychotic effects. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 1305–1318 (2015).
  341. Pertwee, R. G. Pharmacological and therapeutic targets for  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Euphytica* **140**, 73–82 (2004).
  342. Pertwee, R. G. Cannabidiol as a potential medicine. in *Cannabinoids as Therapeutics* 47–65 (Birkhäuser-Verlag, 2005). doi:10.1007/3-7643-7358-X\_3.
  343. Izzo, A. A., Borrelli, F., Capasso, R., Di Marzo, V. & Mechoulam, R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 515–27 (2009).
  344. Russo, E. B. Correspondence Taming THC : potential entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 1344–1364 (2011).
  345. Wolf, S. A. *et al.* Open Access RESEARCH Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cell Communication and Signaling* vol. 8 <http://www.biosignaling.com/content/8/1/12> (2010).
  346. Bhattacharyya, S. *et al.* Opposite effects of  $\Delta^8$ -9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. *Neuropsychopharmacology* **35**, 764–774 (2010).
  347. Ledgerwood, C. J., Greenwood, S. M., Brett, R. R., Pratt, J. A. & Bushell, T. J. Cannabidiol inhibits synaptic transmission in rat hippocampal cultures and slices via multiple receptor pathways. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 286–294 (2011).
  348. Thomas, A. *et al.* Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB 1 and CB 2 receptor agonists in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 613–623 (2007).
  349. Lunn, C. A. *et al.* A novel cannabinoid peripheral cannabinoid receptor-selective inverse agonist blocks leukocyte recruitment in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**, 780–8 (2006).
  350. Bisogno, T. *et al.* Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 845–852 (2001).
  351. Leweke, F. M. *et al.* Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl. Psychiatry* **2**, e94 (2012).
  352. Campos, A. C. *et al.* The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **16**, 1407–19 (2013).
  353. Howlett, A. C., Scott, D. K. & Wilken, G. H. Regulation of adenylyl cyclase by cannabinoid drugs. Insights based on thermodynamic studies. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 3297–3304 (1989).
  354. Wagner, H. Natural products chemistry and phytomedicine research in the new millennium: new developments and challenges. *Arkivoc* **2004**, 277 (2004).
  355. Yamamoto, I. *et al.* Pharmacology and Toxicology of Major Constituents of Marijuana - On the Metabolic Activation of Cannabinoids and Its Mechanism. *J. Toxicol. - Toxin Rev.* **22**, 577–589 (2003).
  356. Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togni, G. I. & Latina, V. Cannabidiol Reduces Ab-Induced Neuroinflammation and Promotes Hippocampal Neurogenesis through PPARc Involvement. *PLoS One* **6**, 28668 (2011).
  357. Carrier, E. J., Auchampach, J. A. & Hillard, C. J. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: A mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7895–7900 (2006).
  358. Liou, G. I. *et al.* Mediation of cannabidiol anti-inflammation in the retina by equilibrative nucleoside transporter and A2A adenosine receptor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 5526–31 (2008).
  359. Ribeiro, A. *et al.* Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **678**, 78–85 (2012).

360. Xiong, W. *et al.* Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting  $\alpha 3$  glycine receptors. *J. Exp. Med.* **209**, 1121–34 (2012).
361. Merkus, F. W. H. M. Cannabivarin and tetrahydrocannabivarin, two new constituents of hashish [29]. *Nature* vol. 232 579–580 (1971).
362. Hill, A. J. *et al.* Cannabidivarin is anticonvulsant in mouse and rat. *Br. J. Pharmacol.* **167**, 1629–1642 (2012).
363. Crombie, L., Ponsford, R., Shani, A., Yagnitinsky, B. & Mechoulam, R. Hashish components. Photochemical production of cannabicyclol from cannabichromene. *Tetrahedron Lett.* **9**, 5771–5772 (1968).
364. Degenhardt, F., Stehle, F. & Kayser, O. *The Biosynthesis of Cannabinoids. Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-12-800756-3.00002-8.
365. Zirpel, B., Kayser, O. & Stehle, F. Elucidation of structure-function relationship of THCA and CBDA synthase from Cannabis sativa L. *J. Biotechnol.* **284**, 17–26 (2018).
366. Pellati, F. *et al.* New Methods for the Comprehensive Analysis of Bioactive Compounds in Cannabis sativa L. (hemp). *Molecules* **23**, 2639 (2018).
367. Ligresti, A. *et al.* Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**, 1375–1387 (2006).
368. D'Aniello, E. *et al.* Identification and characterization of phytocannabinoids as novel dual PPAR $\alpha$ /y agonists by a computational and in vitro experimental approach. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1863**, 586–597 (2019).
369. Ruhaak, L. R. *et al.* Evaluation of the cyclooxygenase inhibiting effects of six major cannabinoids isolated from Cannabis sativa. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 774–778 (2011).
370. Bolognini, D. *et al.* Cannabidiolic acid prevents vomiting in Suncus murinus and nausea-induced behaviour in rats by enhancing 5-HT1A receptor activation. *Br. J. Pharmacol.* **168**, 1456–70 (2013).
371. Rock, E. M., Limebeer, C. L. & Parker, L. A. Effect of cannabidiolic acid and  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol on carrageenan-induced hyperalgesia and edema in a rodent model of inflammatory pain. *Psychopharmacology (Berl.)* **235**, 3259–3271 (2018).
372. Bagdy, G., Kecskemeti, V., Riba, P. & Jakus, R. Serotonin and epilepsy. *Journal of Neurochemistry* vol. 100 857–873 (2007).
373. Takeda, S. *et al.* Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicol Lett* **214**, 314–319 (2012).
374. Pellesi, L. *et al.* Pharmacokinetics and tolerability of oral cannabis preparations in patients with medication overuse headache (MOH)—a pilot study. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **74**, 1427–1436 (2018).
375. Guy, G. W. & Stott, C. G. The development of Sativex® — a natural cannabis-based medicine. *Cannabinoids as Ther.* 231–263 (2005) doi:10.1007/3-7643-7358-x\_14.
376. Poddighe, L. *et al.* Acute administration of beta-caryophyllene prevents endocannabinoid system activation during transient common carotid artery occlusion and reperfusion. *Lipids Health Dis.* **17**, 23 (2018).
377. Gertsch, J. *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 9099–9104 (2008).
378. Sharma, C. *et al.* Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of  $\beta$ -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 3237–3264 (2016).
379. Wu, C. *et al.* Trans-Caryophyllene is a natural agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **24**, 3168–3174 (2014).
380. Elmann, A. *et al.* Protective effects of the essential oil of Salvia fruticosa and its constituents on astrocytic susceptibility to hydrogen peroxide-induced cell death. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 6636–6641 (2009).
381. Alberti, T., Barbosa, W., Vieira, J., Raposo, N. & Dutra, R. (–)- $\beta$ -Caryophyllene, a CB2 Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Motor Paralysis and Neuroinflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 691 (2017).
382. Tabana, Y. M. *et al.* In vivo anti-inflammatory activity of  $\beta$ -caryophyllene, evaluated by molecular imaging. *Mol. Med. Chem.* **1**, 1001 (2016).
383. Aly, E., Khajah, M. A. & Masocha, W.  $\beta$ -Caryophyllene, a CB2-Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Mechanical Allodynia in a Mouse Model of Antiretroviral-Induced Neuropathic Pain. *Molecules* **25**, 106 (2019).
384. Galdino, P. M. *et al.* The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component,  $\beta$ -caryophyllene, in male mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **38**, 276–84 (2012).
385. Bukiya, A. N. Physiology of the Endocannabinoid System During Development. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1162**, 13–37 (2019).
386. Velasco, G., Sánchez, C. & Guzmán, M. Anticancer mechanisms of cannabinoids. *Current Oncology* vol. 23 523–532 (2016).
387. Galve-Roperh, I. *et al.* Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat. Med.* **6**, 313–319 (2000).
388. de Salas-Quiroga, A. *et al.* Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB 1 receptors on developing cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 13693–13698 (2015).
389. Gunduz-Cinar, O. *et al.* Convergent translational evidence of a role for anandamide in amygdala-mediated fear extinction, threat processing and stress-reactivity. *Mol. Psychiatry* **18**, 813–823 (2013).
390. Razavi, B. M. & Hosseinzadeh, H. A review of the role of orexin system in pain modulation. *Biomed. Pharmacother.* **90**, 187–193 (2017).
391. S.G., W., D.R., S., J.J., B. & V., C. The role of the endocannabinoid system in pain. *Handb. Exp. Pharmacol.* **227**, 119–143 (2015).
392. Bouchard, J. F., Casanova, C., Cécyre, B. & Redmond, W. J. Expression and function of the endocannabinoid system in the retina and the visual brain. *Neural Plast.* **2016**, (2016).
393. Dipatrizio, N. V. Endocannabinoids in the Gut. *Cannabis Cannabinoid Res.* **1**, 67–77 (2016).
394. Cani, P. D. *et al.* Endocannabinoids-at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **12**, 133–143 (2016).
395. Maia, J. *et al.* The endocannabinoid system expression in the female reproductive tract is modulated by estrogen. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **174**, 40–47 (2017).
396. Walker, O. L. S., Holloway, A. C. & Raha, S. The role of the endocannabinoid system in female reproductive tissues. *J. Ovarian Res.* **12**, 1–10 (2019).
397. Ramírez-López, M. T. *et al.* A moderate diet restriction during pregnancy alters the levels of endocannabinoids and endocannabinoid-related lipids in the hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb of rat offspring in a sex-specific manner. *PLoS One* **12**, (2017).
398. Balsevich, G., Petrie, G. N. & Hill, M. N. Endocannabinoids: Effectors of glucocorticoid signaling. *Front. Neuroendocrinol.* **47**, 86–108 (2017).
399. Hillard, C. J., Beatka, M. & Sarvaideo, J. Endocannabinoid Signaling and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. in *Comprehensive Physiology* vol. 7 1–15 (John Wiley & Sons, Inc., 2016).
400. Ofek, O. *et al.* Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 696–701 (2006).
401. Sierra, S., Luquin, N. & Navarro-Otano, J. The endocannabinoid system in cardiovascular function: novel insights and clinical implications. *Clin. Auton. Res.* **28**, 35–52 (2018).
402. Harkany, T. *et al.* The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 28 83–92 (2007).
403. Basavarajappa, B., Nixon, R. & Arancio, O. Endocannabinoid System: Emerging Role from Neurodevelopment to Neurodegeneration. *Mini-Reviews Med. Chem.* **9**, 448–462 (2009).
404. Fernández-Ruiz, J., Berrendero, F., Hernández, M. L. & Ramos, J. A. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends in Neurosciences* vol. 23 14–20 (2000).
405. Fernández-Ruiz, J. J., Berrendero, F., Hernández, M. L., Romero, J. & Ramos, J. A. Role of endocannabinoids in brain development. *Life Sci.* **65**, 725–736 (1999).
406. Bénard, G. *et al.* Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat. Neurosci.* **15**, 558–564 (2012).
407. Den Boon, F. S. *et al.* Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 3534–3539 (2012).
408. Chávez, A. E., Chiu, C. Q. & Castillo, P. E. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* **13**, 1511–8 (2010).
409. Ben Achour, S. & Pascual, O. Glia: The many ways to modulate synaptic plasticity. *Neurochem. Int.* **57**, 440–445 (2010).
410. Lee, E. & Chung, W. Glial Control of Synapse Number in Healthy and Diseased Brain. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 1–8 (2019).
411. Navarrete, M., Díez, A. & Araque, A. Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369**, 20130599 (2014).

- (2014).
412. Vainchtein, I. D. *et al.* Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development. *Science* (80-. ). **359**, 1269–1273 (2018).
  413. Stella, N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* **58**, 1017–1030 (2010).
  414. Perea, G. & Araque, A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci.* **25**, 2192–2203 (2005).
  415. Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J. C. & Robitaille, R. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J. Neurosci.* **26**, 5370–5382 (2006).
  416. Weinhard, L. *et al.* Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
  417. Colonna, M. & Butovsky, O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 441–468 (2017).
  418. Paolicelli, R. C. *et al.* TDP-43 Depletion in Microglia Promotes Amyloid Clearance but Also Induces Synapse Loss Article TDP-43 Depletion in Microglia Promotes Amyloid Clearance but Also Induces Synapse Loss. *Neuron* **1**–12 (2017) doi:10.1016/j.neuron.2017.05.037.
  419. Lim, S. *et al.* Neuronal Synapse Formation Induced by Microglia and Interleukin 10. **8**, 1–13 (2013).
  420. Akiyoshi, R. *et al.* Microglia Enhance Synapse Activity to Promote Local Network Synchronization. **5**, 1–13 (2018).
  421. Gabrielli, M. *et al.* Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles. *EMBO Rep.* **16**, 213–220 (2015).
  422. Hong, S., Dissing-Olesen, L. & Stevens, B. New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **36**, 128–134 (2016).
  423. Aguado, T. *et al.* The Endocannabinoid System Promotes Astroglial Differentiation by Acting on Neural Progenitor Cells. (2006) doi:10.1523/JNEUROSCI.3101-05.2006.
  424. Viveros, M.-P., Marco, E.-M., Llorente, R. & López-Gallardo, M. Endocannabinoid System and Synaptic Plasticity: Implications for Emotional Responses. *Neural Plast.* **2007**, (2007).
  425. Marsicano, G. CB1 Cannabinoid Receptors and On-Demand Defense Against Excitotoxicity. *Science* (80-. ). **302**, 84–88 (2003).
  426. Lastres-Becker, I., De Miguel, R. & Fernández-Ruiz, J. J. The endocannabinoid system and Huntington's disease. *Current drug targets. CNS and neurological disorders* vol. 2 335–347 (2003).
  427. Fernández-Ruiz, J., Romero, J. & Ramos, J. A. Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others. in *Endocannabinoids* 233–259 (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-20825-1\_8.
  428. Dean, B., Sundram, S., Bradbury, R., Scarr, E. & Copolov, D. D. Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: Regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience* **103**, 9–15 (2001).
  429. GÓMEZ DEL PULGAR, T., VELASCO, G. & GUZMÁN, M. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem. J.* **347**, 369 (2000).
  430. Galve-Roperh, I., Rueda, D., Del Pulgar, T. G., Velasco, G. & Guzmán, M. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB1 cannabinoid receptor. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1385–1392 (2002).
  431. Fernández-Ruiz, J., Moro, M. A. & Martínez-Orgado, J. Cannabinoids in Neurodegenerative Disorders and Stroke/Brain Trauma: From Preclinical Models to Clinical Applications. *Neurotherapeutics* **12**, 793–806 (2015).
  432. Giacoppo, S., Mandolino, G., Galuppo, M., Bramanti, P. & Mazzon, E. Cannabinoids: New Promising Agents in the Treatment of Neurological Diseases. *Molecules* **19**, 18781–18816 (2014).
  433. Kim, K., Moore, D. H., Makriyannis, A. & Abood, M. E. AM1241, a cannabinoid CB2 receptor selective compound, delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* **542**, 100–105 (2006).
  434. Fernández-Ruiz, J. The biomedical challenge of neurodegenerative disorders: an opportunity for cannabinoid-based therapies to improve on the poor current therapeutic outcomes. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 1370–1383 (2019).
  435. Gugliandolo, A., Pollastro, F., Grassi, G., Bramanti, P. & Mazzon, E. In vitro model of neuroinflammation: Efficacy of cannabigerol, a non-psychoactive cannabinoid. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
  436. Rossi, S., Bernardi, G. & Centonze, D. The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **224**, 92–102 (2010).
  437. Chiurchiù, V., Orlicchio, A. & Maccarrone, M. Is modulation of oxidative stress an answer? the state of the art of redox therapeutic actions in neurodegenerative diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, (2016).
  438. Marsicano, G., Moosmann, B., Hermann, H., Lutz, B. & Behl, C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: Role of the cannabinoid receptor CB1. *J. Neurochem.* **80**, 448–456 (2002).
  439. Matthews, A. T. *et al.* Oxyradical stress increases the biosynthesis of 2-arachidonoylglycerol: Involvement of NADPH oxidase. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **311**, C960–C974 (2016).
  440. Tiyerili, V. *et al.* CB1 receptor inhibition leads to decreased vascular AT1 receptor expression, inhibition of oxidative stress and improved endothelial function. *Basic Res. Cardiol.* **105**, 465–477 (2010).
  441. Merighi, S. *et al.* Cannabinoid CB2 receptors modulate ERK-1/2 kinase signalling and NO release in microglial cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *British Journal of Pharmacology* vol. 165 1773–1788 (2012).
  442. Cassano, T. *et al.* From Cannabis sativa to Cannabidiol: Promising Therapeutic Candidate for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Front. Pharmacol.* **11**, 1–10 (2020).
  443. Sun, Y. *et al.* Cannabinoid activation of PPARα; a novel neuroprotective mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 734–743 (2007).
  444. Gallelli, C. A. *et al.* Modulation of the oxidative stress and lipid peroxidation by endocannabinoids and their lipid analogues. *Antioxidants* vol. 7 (2018).
  445. Rosenberg, E. C., Tsien, R. W., Whalley, B. J. & Devinsky, O. Cannabinoids and Epilepsy. *Neurotherapeutics* vol. 12 747–768 (2015).
  446. Díaz-Alonso, J. *et al.* VCE-003.2, a novel cannabigerol derivative, enhances neuronal progenitor cell survival and alleviates symptomatology in murine models of Huntington's disease. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
  447. Alonso-Alconada, D., Álvarez, F. J., Goñi-De-cerio, F., Hilario, E. & Álvarez, A. Cannabinoid-mediated modulation of oxidative stress and early inflammatory response after hypoxia-ischemia. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
  448. Cristino, L., Bisogno, T. & Di Marzo, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **16**, 9–29 (2020).
  449. Bisogno, T. & Di Marzo, V. Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Role in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Disorders. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **9**, 564–573 (2012).
  450. Zoppi, S. *et al.* Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* **36**, 805–818 (2011).
  451. Sánchez, A. J. & García-Merino, A. Neuroprotective agents: Cannabinoids. *Clinical Immunology* vol. 142 57–67 (2012).
  452. Mastinu, A. *et al.* Cannabinoids in health and disease: Pharmacological potential in metabolic syndrome and neuroinflammation. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **36**, 1–15 (2018).
  453. Centonze, D., Rossi, S., Finazzi-Agrò, A., Bernardi, G. & Maccarrone, M. The (Endo)Cannabinoid System in Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int. Rev. Neurobiol.* **82**, 171–186 (2007).
  454. Tchanchou, F. *et al.* The fatty acid amide hydrolase inhibitor PF-3845 promotes neuronal survival, attenuates inflammation and improves functional recovery in mice with traumatic brain injury. *Neuropharmacology* **85**, 427–439 (2014).
  455. Kelly, R., Joers, V., Tansey, M. G., McKernan, D. P. & Dowd, E. Microglial phenotypes and their relationship to the cannabinoid system: Therapeutic implications for Parkinson's disease. *Molecules* **25**, (2020).
  456. Witting, A. *et al.* P2X7 receptors control 2AG production by microglial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 3214–3219 (2004).
  457. Walter, L. *et al.* Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci.* **23**, 1398–1405 (2003).
  458. Panikashvili, D. *et al.* The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol. Dis.* **22**, 257–264 (2006).
  459. Chung, Y. C. *et al.* Cannabinoid Receptor Type 1 Protects Nigrostriatal Dopaminergic Neurons against MPTP Neurotoxicity by Inhibiting Microglial Activation. *J. Immunol.* **187**, 6508–6517 (2011).
  460. Fernández-Ruiz, J. *et al.* Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 39–45 (2007).
  461. Shoemaker, J. L., Seely, K. A., Reed, R. L., Crow, J. P. & Prather, P. L. The CB2 cannabinoid

- agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset. *J. Neurochem.* **101**, 87–98 (2006).
462. Espejo-Porras, F. *et al.* Targeting glial cannabinoid CB2 receptors to delay the progression of the pathological phenotype in TDP-43 (A315T) transgenic mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 1585–1600 (2019).
463. Braun, M. *et al.* Selective activation of cannabinoid receptor-2 reduces neuroinflammation after traumatic brain injury via alternative macrophage polarization. *Brain. Behav. Immun.* **68**, 224–237 (2018).
464. Zoppi, S. *et al.* Regulatory role of the cannabinoid CB2 receptor in stress-induced neuroinflammation in mice. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2814–2826 (2014).
465. Rom, S. & Persidsky, Y. Cannabinoid receptor 2: Potential role in immunomodulation and neuroinflammation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **8**, 608–620 (2013).
466. Mecha, M. *et al.* Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia. *Brain. Behav. Immun.* **49**, 233–245 (2015).
467. Chen, Z. & Trapp, B. D. Microglia and neuroprotection. *J. Neurochem.* **136**, 10–17 (2016).
468. McHugh, D. GPR18 in microglia: Implications for the CNS and endocannabinoid system signalling. *Br. J. Pharmacol.* **167**, 1575–1582 (2012).
469. Saliba, S. W. *et al.* Anti-neuroinflammatory effects of GPR55 antagonists in LPS-activated primary microglial cells. *J. Neuroinflammation* **15**, 1–13 (2018).
470. García, C. *et al.* Benefits of VCE-003.2, a cannabigerol quinone derivative, against inflammation-driven neuronal deterioration in experimental Parkinson's disease: Possible involvement of different binding sites at the PPAR $\gamma$  receptor. *J. Neuroinflammation* **15**, (2018).
471. Rodríguez-Cueto, C. *et al.* Neuroprotective effects of the cannabigerol quinone derivative VCE-003.2 in SOD1G93A transgenic mice, an experimental model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Pharmacol.* **157**, 217–226 (2018).
472. Agüeroles, J. *et al.* Oral administration of the cannabigerol derivative VCE-003.2 promotes subventricular zone neurogenesis and protects against mutant huntingtin-induced neurodegeneration. *Transl. Neurodegener.* **8**, (2019).
473. Honda, S. *et al.* Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J. Neurosci.* **21**, 1975–1982 (2001).
474. Parisi, C. *et al.* Dysregulated microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis microglia modulate genes linked to neuroinflammation. *Cell Death Dis.* **4**, 1–10 (2013).
475. Alvarez-Erviti, L. *et al.* Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch. Neurol.* **67**, 1464–1472 (2010).
476. Pickford, F. *et al.* The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid  $\beta$  accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 2190–2199 (2008).
477. Choi, A. M. K., Ryter, S. W. & Levine, B. Mechanisms of disease: Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* **368**, 651–662 (2013).
478. Kataoka, K. *et al.* Age-dependent Alteration in Mitochondrial Dynamics and Autophagy in Hippocampal Neuron of Cannabinoid CB1 Receptor-deficient Mice. *Brain Res. Bull.* **160**, 40–49 (2020).
479. Wu, Q., Zhang, M., Liu, X., Zhang, J. & Wang, H. CB2R orchestrates neuronal autophagy through regulation of the mTOR signaling pathway in the hippocampus of developing rats with status epilepticus. *Int. J. Mol. Med.* **45**, 475–484 (2020).
480. Wu, A., Hu, P., Lin, J., Xia, W. & Zhang, R. Activating cannabinoid receptor 2 protects against diabetic cardiomyopathy through autophagy induction. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–10 (2018).
481. Wang, D. P. *et al.* The potential protective effects of cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 on cognitive dysfunction is associated with the suppression of autophagy and inflammation in an experimental model of vascular dementia. *Psychiatry Res.* **267**, 281–288 (2018).
482. Hosseinzadeh, M., Nikseresh, S., Khodaghali, F., Naderi, N. & Maghsoudi, N. Cannabidiol Post-Treatment Alleviates Rat Epileptic-Related Behaviors and Activates Hippocampal Cell Autophagy Pathway Along with Antioxidant Defense in Chronic Phase of Pilocarpine-Induced Seizure. *J. Mol. Neurosci.* **58**, 432–440 (2016).
483. Burgaz, S., García, C., Gómez-Cañas, M., Muñoz, E. & Fernández-Ruiz, J. Development of an oral treatment with the PPAR- $\gamma$ -acting cannabinoid VCE-003.2 against the inflammation-driven neuronal deterioration in experimental Parkinson's disease. *Molecules* **24**, (2019).
484. Cheah, B. C., Vucic, S., Krishnan, A. & Kiernan, M. C. Riluzole, Neuroprotection and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Med. Chem.* **17**, 1942–1959 (2010).
485. Chiò, A., Mora, G. & Lauria, G. Pain in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* **16**, 144–157 (2017).
486. Amtmann, D. *et al.* Survey of cannabis use in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hosp. Palliat. Med.* **21**, 95–104 (2004).
487. Meyer, T. *et al.* Real world experience of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in the treatment of spasticity using tetrahydrocannabinol:cannabidiol (THC:CBD). *BMC Neurol.* **19**, 1–13 (2019).
488. Urbi, B., Broadley, S., Bedlack, R., Russo, E. & Sabet, A. Study protocol for a randomised, double-blind, placebo-controlled study evaluating the Efficacy of cannabis-based Medicine Extract in slowing the disease pRogression of Amyotrophic Lateral sclerosis or motor neurone Disease: The EMERALD trial. *BMJ Open* **9**, 1–7 (2019).
489. Urbi, B. *et al.* Effects of cannabinoids in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) murine models: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurochem.* **149**, 284–297 (2019).
490. Witting, A. *et al.* Endocannabinoids accumulate in spinal cord of SOD1G93A transgenic mice. *J. Neurochem.* **89**, 1555–1557 (2004).
491. Bilsland, L. G. *et al.* Increasing cannabinoid levels by pharmacological and genetic manipulation delays disease progression in SOD1 mice. *FASEB J.* **20**, 1003–1005 (2006).
492. Rossi, S. *et al.* Abnormal sensitivity of cannabinoid CB1 receptors in the striatum of mice with experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* **11**, 83–90 (2010).
493. Petrik, M. S. *et al.* Magnetic Resonance Microscopy and Immunohistochemistry of the CNS of the Mutant SOD Murine Model of ALS Reveals Widespread Neural Deficits. *NeuroMolecular Med.* **9**, 216–229 (2007).
494. Moreno-Martet, M., Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J. & De Lago, E. Changes in endocannabinoid receptors and enzymes in the spinal cord of SOD1G93A transgenic mice and evaluation of a sativex®-like combination of phytocannabinoids: Interest for future therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurosci. Ther.* **20**, 809–815 (2014).
495. Zanette, G. *et al.* Changes in motor cortex inhibition over time in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* **249**, 1723–1728 (2002).
496. Spreux-Varoquaux, O. *et al.* Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: A reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J. Neurol. Sci.* **193**, 73–78 (2002).
497. Maragakis, N. J. & Rothstein, J. D. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch. Neurol.* **58**, 365–370 (2001).
498. Vermeiren, C. *et al.* Loss of metabotropic glutamate receptor-mediated regulation of glutamate transport in chemically activated astrocytes in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **96**, 719–731 (2006).
499. Vergouts, M., Doyen, P. J., Peeters, M., Opsomer, R. & Hermans, E. Constitutive downregulation protein kinase C epsilon in hSOD1G93A astrocytes influences mGluR5 signaling and the regulation of glutamate uptake. *Glia* **66**, 749–761 (2018).
500. Doherty, J. & Dingledine, R. Functional interactions between cannabinoid and metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**, 46–53 (2003).
501. Casanovas, A., Hernández, S., Tarabal, O., Rosselló, J. & Esquerda, J. E. Strong P2X4 purinergic receptor-like immunoreactivity is selectively associated with degenerating neurons in transgenic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Comp. Neurol.* **506**, 75–92 (2008).
502. Volonté, C., Apolloni, S., Parisi, C. & Amadio, S. Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology* **104**, 180–193 (2016).
503. Csölle, C. & Sperlágh, B. Endocannabinergic modulation of interleukin-1 $\beta$  in mouse hippocampus under basal conditions and after in vivo systemic lipopolysaccharide stimulation. *Neuroimmunomodulation* **18**, 226–231 (2011).
504. Parmentier-Batteur, S., Jin, K., Mao, X. O., Xie, L. & Greenberg, D. A. Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. *J. Neurosci.* **22**, 9771–9775 (2002).
505. Boks, M. P. *et al.* Cannabinoids and psychotic symptoms: A potential role for a genetic variant in the P2X purinoceptor 7 (P2RX7) gene. *Brain. Behav. Immun.* **7**, (2020).
506. Liu, C., Ma, H., Slitt, A. L. & Seeram, N. P. Inhibitory Effect of Cannabidiol on the Activation of NLRP3 Inflammasome Is Associated with Its Modulation of the P2X7 Receptor in Human Monocytes. *J. Nat. Prod.* **2–6** (2020) doi:10.1021/acs.jnatprod.0c00138.

507. Fornai, F. *et al.* Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2052–2057 (2008).
508. Pasquali, L. *et al.* Autophagy, lithium, and amyotrophic lateral sclerosis: A randomised, double-blind crossover trial. *Muscle Nerve* **40**, 173–194 (2009).
509. Aggarwal, S., Zinman, L. & Simpson, E. Clinical trial testing lithium in ALS terminates early for futility. *Lancet* **9**, 481–488 (2010).
510. Weber, M., Goldman, B. & Truniger, S. Tetrahydrocannabinol (THC) for cramps in amyotrophic lateral sclerosis: A randomised, double-blind crossover trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **81**, 1135–1140 (2010).
511. Riva, N. *et al.* Safety and efficacy of nabiximols on spasticity symptoms in patients with motor neuron disease (CANALS): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* **18**, 155–164 (2019).
512. Fernández-Ruiz, J., Pazos, M. R., García-Arencibia, M., Sagredo, O. & Ramos, J. A. Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286**, (2008).
513. Hanuš, L. *et al.* HU-308: A specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14228–14233 (1999).
514. Gómez-Cañás, M. *et al.* Biological characterization of PM226, a chromenoisoxazole, as a selective CB2 receptor agonist with neuroprotective profile. *Pharmacol. Res.* **110**, 205–215 (2016).
515. Dash, R. P., Babu, R. J. & Srinivas, N. R. Two Decades-Long Journey from Riluzole to Edaravone: Revisiting the Clinical Pharmacokinetics of the Only Two Amyotrophic Lateral Sclerosis Therapeutics. *Clin. Pharmacokinet.* **57**, 1385–1398 (2018).
516. Rothstein, J. D. Edaravone: A new drug approved for ALS. *Cell* **171**, 725 (2017).
517. Del Signore, S. J. *et al.* Combined riluzole and sodium phenylbutyrate therapy in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotroph. Lateral Scler.* **10**, 85–94 (2009).
518. Li, J., Sung, M. & Rutkove, S. B. Electrophysiologic Biomarkers for Assessing Disease Progression and the Effect of Riluzole in SOD1 G93A ALS Mice. *PLoS One* **8**, 1–7 (2013).
519. Yang, T. *et al.* Verapamil and riluzole cocktail liposomes overcome pharmacoresistance by inhibiting P-glycoprotein in brain endothelial and astrocyte cells: A potent approach to treat amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **120**, 30–39 (2018).
520. Chen, S. *et al.* Riluzole Exhibits No Therapeutic Efficacy On a Transgenic Rat model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Neurovasc. Res.* **17**, (2020).
521. Liachko, N. F., Guthrie, C. R. & Kraemer, B. C. Phosphorylation promotes neurotoxicity in a Caenorhabditis elegans model of TDP-43 proteinopathy. *J. Neurosci.* **30**, 16208–16219 (2010).
522. Oakes, M. D., Law, W. J., Clark, T., Bamber, B. A. & Komuniecki, R. Cannabinoids Activate Monoaminergic Signaling to Modulate Key C. elegans Behaviors. *J. Neurosci.* **37**, 2859–2869 (2017).
523. Pastuhov, S. I., Matsumoto, K. & Hisamoto, N. Endocannabinoid signaling regulates regenerative axon navigation in Caenorhabditis elegans via the GPCRs NPR-19 and NPR-32. *Genes to Cells* **21**, 696–705 (2016).
524. Russo, E. B. Clinical Endocannabinoid Deficiency Reconsidered: Current Research Supports the Theory in Migraine, Fibromyalgia, Irritable Bowel, and Other Treatment-Resistant Syndromes. *Cannabis cannabinoid Res.* **1**, 154–165 (2016).
525. Węgorzewska, I., Bell, S., Cairns, N. J., Miller, T. M. & Baloh, R. H. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18809–18814 (2009).
526. López, A. *et al.* Cannabinoid CB2 receptors in the mouse brain: Relevance for Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* **15**, 158 (2018).
527. Ari, C. *et al.* Metabolic therapy with deanna protocol supplementation delays disease progression and extends survival in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mouse model. *PLoS One* **9**, (2014).
528. Hogg, M. C., Halang, L., Woods, I., Coughlan, K. S. & Prehn, J. H. M. Riluzole does not improve lifespan or motor function in three ALS mouse models. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **19**, 438–445 (2018).
529. Guyenet, S. J. *et al.* A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *J. Vis. Exp.* 1–3 (2010) doi:10.3791/1787.
530. Patel, S. *et al.* The general anesthetic propofol increases brain N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) content and inhibits fatty acid amide hydrolase. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 1005–1013 (2003).
531. Schelling, G. *et al.* Effects of general anesthesia on anandamide blood levels in humans. *Anesthesiology* **104**, 273–277 (2006).
532. Dubowitz, V., Sewry, C. A. & Oldfors, A. Histological and Histochemical Stains and Reactions. in *Muscle Biopsy* 14–23 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-7020-7471-4.00002-1.
533. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* vol. 9 671–675 (2012).
534. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
535. Hirai, T. *et al.* The Prevalence and Phenotype of Activated Microglia/Macrophages within the Spinal Cord of the Hyperostotic Mouse (twy/twy) Changes in Response to Chronic Progressive Spinal Cord Compression: Implications for Human Cervical Compressive Myelopathy. *PLoS One* **8**, (2013).
536. Saiwai, H. *et al.* The LT $\beta$ 4-BLT1 axis mediates neutrophil infiltration and secondary injury in experimental spinal cord injury. *Am. J. Pathol.* **176**, 2352–2366 (2010).
537. Brenner, S. The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics* **77**, 71–94 (1974).
538. Robatzek, M. & Thomas, J. H. *Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Regulates Caenorhabditis elegans Locomotion in Concert With a G o /G q Signaling Network.* (2000).
539. Crittenden, S. L. & Kimble, J. Confocal methods for Caenorhabditis elegans. *Methods Mol. Biol.* **122**, 141–151 (1999).
540. Hewitt, J. E. *et al.* Muscle strength deficiency and mitochondrial dysfunction in a muscular dystrophy model of Caenorhabditis elegans and its functional response to drugs. *DMM Dis. Model. Mech.* **11**, (2018).
541. Chen, L., Krause, M., Sepanski, M. & Fire, A. The Caenorhabditis elegans MYOD homologue HLH-1 is essential for proper muscle function and complete morphogenesis. *Development* **120**, 1631–41 (1994).
542. Carre-Pierrat, M. *et al.* Blocking of striated muscle degeneration by serotonin in C. elegans. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **27**, 253–258 (2006).
543. Etheridge, T. *et al.* The integrin-adhesome is required to maintain muscle structure, mitochondrial ATP production, and movement forces in Caenorhabditis elegans. *FASEB J.* **29**, 1235–1246 (2015).
544. Gieseler, K. Development, structure, and maintenance of C. elegans body wall muscle. *WormBook* 1–59 (2017) doi:10.1895/wormbook.1.81.2.
545. Chiò, A. *et al.* Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph. Lateral Scler.* **10**, 310–323 (2009).
546. Ryan, D., Drysdale, A. J., Lafourcade, C., Pertwee, R. G. & Platt, B. Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *J. Neurosci.* **29**, 2053–2063 (2009).
547. Giacobbo, S. & Mazzon, E. Can cannabinoids be a potential therapeutic tool in amyotrophic lateral sclerosis? *Neural Regen. Res.* **11**, 1896–1899 (2016).
548. Valdeolivas, S., Sagredo, O., Delgado, M., Pozo, M. A. & Fernández-Ruiz, J. Effects of a sativex-like combination of phytocannabinoids on disease progression in R6/2 mice, an experimental model of huntington's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
549. García, C. *et al.* Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid  $\Delta$  9-THCV in animal models of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 1495–1506 (2011).
550. Wright, S. Cannabinoid-Based Medicines for Neurological Disorders—Clinical Evidence. *Mol. Neurobiol.* **36**, 129–136 (2007).
551. Fraguas-Sánchez, A. I. & Torres-Suárez, A. I. Medical Use of Cannabinoids. *Drugs* vol. 78 1665–1703 (2018).
552. Soethoudt, M. *et al.* Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. *Nat. Commun.* **8**, 13958 (2017).
553. Kwak, S. S. *et al.* Amelioration of Behavioral Abnormalities in BH4-deficient Mice by Dietary Supplementation of Tyrosine. *PLoS One* **8**, 2–9 (2013).
554. Alfieri, J. A., Pino, N. S. & Igaz, L. M. Reversible behavioral phenotypes in a conditional mouse model of TDP-43 proteinopathies. *J. Neurosci.* **34**, 15244–15259 (2014).
555. Baker, D. *et al.* Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* **404**, 84–87 (2000).
556. Patejdl, R. & Zettl, U. K. Spasticity in multiple sclerosis: Contribution of inflammation, autoimmune mediated neuronal damage and therapeutic interventions. *Autoimmun. Rev.* **16**, 925–936 (2017).
557. Mecha, M., Carrillo-Salinas, F. J., Feliú, A., Mestre, L. & Guaza, C. Microglia activation states and cannabinoid system: Therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* **166**, 40–55 (2016).
558. Tanaka, M., Sackett, S. & Zhang, Y. Endocannabinoid Modulation of Microglial Phenotypes in Neuropathology. *Front. Neurol.*

- 11, (2020).
559. Picchiarrelli, G. *et al.* FUS-mediated regulation of acetylcholine receptor transcription at neuromuscular junctions is compromised in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* **22**, 1793–1805 (2019).
560. Chand, K. K. *et al.* Defects in synaptic transmission at the neuromuscular junction precede motor deficits in a TDP-43Q331K transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J.* **32**, 2676–2689 (2018).
561. Maimon, R. *et al.* Mir126-5p downregulation facilitates axon degeneration and nmj disruption via a non-cell-autonomous mechanism in ALS. *J. Neurosci.* **38**, 5478–5494 (2018).
562. Oberstadt, M., Claßen, J., Arendt, T. & Holzer, M. TDP-43 and Cytoskeletal Proteins in ALS. *Mol. Neurobiol.* **55**, 3143–3151 (2018).
563. Fallini, C., Bassell, G. J. & Rossoll, W. The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3703–3718 (2012).
564. Perera, N. D. *et al.* Enhancing survival motor neuron expression extends lifespan and attenuates neurodegeneration in mutant TDP-43 mice. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 4080–4093 (2016).
565. Thonhoff, J. R., Simpson, E. P. & Appel, S. H. Neuroinflammatory mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Curr. Opin. Neurol.* **31**, 635–639 (2018).
566. Liu, J. & Wang, F. Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Cellular mechanisms and therapeutic implications. *Front. Immunol.* **8**, 1–12 (2017).
567. Lyon, M. S., Wosiski-Kuhn, M., Gillespie, R., Caress, J. & Milligan, C. Inflammation, Immunity, and amyotrophic lateral sclerosis: I. Etiology and pathology. *Muscle and Nerve* **59**, 10–22 (2019).
568. Franco, R. & Fernández-Suárez, D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **131**, 65–86 (2015).
569. Lee, K. I. *et al.* Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* **13**, 1–16 (2016).
570. Bosson, A. *et al.* TRPA1 channels promote astrocytic Ca<sup>2+</sup> hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- $\beta$  peptide. *Mol. Neurodegener.* **12**, 1–19 (2017).
571. Zhao, D. *et al.* Roles of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in regulating bone cancer pain via TRPA1 signal pathway and beneficial effects of inhibition of neuro-inflammation and TRPA1. *Mol. Pain* **15**, (2019).
572. Joyce, P. I., Fratta, P., Fisher, E. M. C. & Acevedo-Arozena, A. SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: Recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mamm. Genome* **22**, 420–448 (2011).
573. Chiu, I. M. *et al.* T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17913–17918 (2008).
574. Ashton, J. & Glass, M. The Cannabinoid CB2 Receptor as a Target for Inflammation-Dependent Neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol.* **5**, 73–80 (2007).
575. Mao, Y. *et al.* Cannabinoid receptor 2-selective agonist JWH015 attenuates bone cancer pain through the amelioration of impaired autophagy flux induced by inflammatory mediators in the spinal cord. *Mol. Med. Rep.* **20**, 5100–5110 (2019).
576. Pazos, M. R. *et al.* Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: Role of 5HT1A and CB2 receptors. *Neuropharmacology* **71**, 282–291 (2013).
577. Giusto, E. *et al.* Compensatory changes in degenerating spinal motoneurons sustain functional sparing in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Comp. Neurol.* **528**, 231–243 (2020).
578. Barbeito, A. G., Mesci, P. & Boillé, S. Motor neuron-immune interactions: the vicious circle of ALS. *J. Neural Transm.* **117**, 981–1000 (2010).
579. Xie, Y., Weydt, P., Howland, D. S., Kliot, M. & Möller, T. Inflammatory mediators and growth factors in the spinal cord of G93A SOD1 rats. *Neuroreport* **15**, 2513–2516 (2004).
580. Elliott, J. L. Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Brain Res.* **95**, 172–178 (2001).
581. Turner, M. R. *et al.* Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: An [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol. Dis.* **15**, 601–609 (2004).
582. Corcia, P. *et al.* Molecular Imaging of Microglial Activation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* **7**, 6–12 (2012).
583. Liao, B., Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S. & Appel, S. H. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp. Neurol.* **237**, 147–152 (2012).
584. Tang, Y. & Le, W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology* vol. 53 1181–1194 (2016).
585. Brites, D. & Vaz, A. R. Microglia centered pathogenesis in ALS: Insights in cell interconnectivity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 8 (2014).
586. Zhao, W., Beers, D. R. & Appel, S. H. Immune-mediated Mechanisms in the Pathoprogession of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **8**, 888–899 (2013).
587. Yu, S. J. *et al.* Time-dependent protection of CB2 receptor agonist in stroke. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
588. López-Sendón Moreno, J. L. *et al.* A double-blind, randomized, cross-over, placebo-controlled, pilot trial with Sativex in Huntington's disease. *J. Neurol.* **263**, 1390–1400 (2016).
589. VanDolah, H. J., Bauer, B. A. & Mauck, K. F. Clinicians' Guide to Cannabidiol and Hemp Oils. *Mayo Clin. Proc.* **94**, 1840–1851 (2019).
590. Sekar, K. & Pack, A. Epidiolex as adjunct therapy for treatment of refractory epilepsy: A comprehensive review with a focus on adverse effects [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research* **8**, 1–8 (2019).
591. Riedel, G. *et al.* Synthetic and plant-derived cannabinoid receptor antagonists show hypophagic properties in fasted and non-fasted mice. *Br. J. Pharmacol.* **156**, 1154–1166 (2009).
592. Bielawiec, P., Harasim-Symbor, E. & Chabowski, A. Phytocannabinoids: Useful Drugs for the Treatment of Obesity? Special Focus on Cannabidiol. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **11**, 1–11 (2020).
593. Wiley, J. L. *et al.* CB 1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br. J. Pharmacol.* **145**, 293–300 (2005).
594. Tudge, L., Williams, C., Cowen, P. J. & McCabe, C. Neural effects of cannabinoid CB1 neutral antagonist tetrahydrocannabinavarin on food reward and aversion in healthy volunteers. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **18**, 1–9 (2015).
595. Clark, T. M., Jones, J. M., Hall, A. G., Tabner, S. A. & Kmiec, R. L. Theoretical Explanation for Reduced Body Mass Index and Obesity Rates in Cannabis Users. *Cannabis Cannabinoid Res.* **3**, 259–271 (2018).
596. Cluny, N. L., Keenan, C. M., Reimer, R. A., Foll, B. Le & Sharkey, K. A. Prevention of Diet-Induced Obesity Effects on Body Weight and Gut Microbiota in Mice Treated Chronically with  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol. *PLoS One* **10**, 1–12 (2015).
597. Vandoorne, T., De Bock, K. & Van Den Bosch, L. Energy metabolism in ALS: an underappreciated opportunity? *Acta Neuropathol.* **135**, 489–509 (2018).
598. Tefera, T. W. & Borges, K. Metabolic dysfunctions in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis and potential metabolic treatments. *Front. Neurosci.* **10**, (2017).
599. Raman, C. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis: Delayed disease progression in mice by treatment with a cannabinoid. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Mot. Neuron Disord.* **5**, 33–39 (2004).
600. Burkey, T. H., Quock, R. M., Consroe, P., Roeske, W. R. & Yamamura, H. I.  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol is a partial agonist of cannabinoid receptors in mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* **323**, 8–9 (1997).
601. Zhao, P., Ignacio, S., Beattie, E. C. & Abood, M. E. Altered presymptomatic AMPA and cannabinoid receptor trafficking in motor neurons of ALS model mice: implications for excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 572–579 (2008).
602. Irrera, N. *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene Mitigates Collagen Antibody Induced Arthritis (CAIA) in Mice Through a Cross-Talk between CB2 and PPAR- $\gamma$  Receptors. *Biomolecules* **9**, (2019).
603. Assis, L. C. *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. *Neuroscience* **279**, 220–231 (2014).
604. Takeda, S., Misawa, K., Yamamoto, I. & Watanabe, K. Cannabidiolic acid as a selective cyclooxygenase-2 inhibitory component in cannabis. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 1917–1921 (2008).
605. Takeda, S. *et al.* Down-regulation of cyclooxygenase-2 (cox-2) by cannabidiolic acid in human breast cancer cells. *J. Toxicol. Sci.* **39**, 711–716 (2014).
606. Hirao-Suzuki, M., Takeda, S., Koga, T., Takiguchi, M. & Toda, A. Cannabidiolic acid dampens the expression of cyclooxygenase-2 in MDA-MB-231 breast cancer cells: Possible implication of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  abrogation. *J. Toxicol. Sci.* **45**, 227–236 (2020).
607. Vigli, D., Cosentino, L., Pellas, M. & Filippis, B. De. Chronic treatment with cannabidiolic acid (CBDA) reduces thermal pain sensitivity in male mice and rescues the hyperalgesia in a mouse model of Rett syndrome. *Neuroscience* (2020)

608. Xu, X. *et al.* N-Oleylethanolamine Reduces Inflammatory Cytokines and Adhesion Molecules in TNF- $\alpha$ -induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Activating CB2 and PPAR- $\alpha$ . *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **68**, 280–291 (2016).
609. Pellati, F. *et al.* Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *Biomed Res. Int.* **2018**, 1–15 (2018).
610. Turner, M. R. *et al.* Cortical 5-HT1A receptor binding in patients with homozygous D90A SOD1 vs sporadic ALS. 1232–1236 (2007).
611. Turner, M. R. *et al.* [11C]-WAY100635 PET demonstrates marked 5-HT1A receptor changes in sporadic ALS. *Brain* **128**, 896–905 (2005).
612. El Oussini, H. *et al.* Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **82**, 444–456 (2017).
613. Dentel, C. *et al.* Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: A link to spasticity. *Brain* **136**, 483–493 (2013).
614. Vercruyse, P. *et al.* Alterations in the hypothalamic melanocortin pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **139**, 1106–1122 (2016).
615. Murillo-Rodríguez, E., Arankowsky-Sandoval, G., Pertwee, R. G., Parker, L. & Mechoulam, R. Sleep and neurochemical modulation by cannabidiolic acid methyl ester in rats. *Brain Res. Bull.* **155**, 166–173 (2020).
616. Joardar, A. *et al.* PPAR gamma activation is neuroprotective in a Drosophila model of ALS based on TDP-43. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 1741–1754 (2015).
617. Zhao, W. *et al.* Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) improves motor performance and survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.* **6**, 51 (2011).
618. Benedusi, V., Martorana, F., Brambilla, L., Maggi, A. & Rossi, D. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) controls natural protective mechanisms against lipid peroxidation in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **287**, 35899–35911 (2012).
619. Larsen, P. J. *et al.* Differential influences of peroxisome proliferator-activated receptors and  $\alpha$  on food intake and energy homeostasis. *Diabetes* **52**, 2249–2259 (2003).
620. Wójtowicz, S., Strosznajder, A. K., Jeżyna, M. & Strosznajder, J. B. The Novel Role of PPAR Alpha in the Brain: Promising Target in Therapy of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Neurochem. Res.* **45**, 972–988 (2020).
621. Perluigi, M., Coccia, R. & Allan Butterfield, D. 4-hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: A toxic combination illuminated by redox proteomics studies. *Antioxidants Redox Signal.* **17**, 1590–1609 (2012).
622. Cutler, R. G., Pedersen, W. A., Camandola, S., Rothstein, J. D. & Mattson, M. P. Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress - Induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **52**, 448–457 (2002).
623. Jaiswal, M. K. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med. Res. Rev.* **39**, 733–748 (2019).
624. Garberg, H. T. *et al.* High-dose cannabidiol induced hypotension after global hypoxia-ischemia in piglets. *Neonatology* **112**, 143–149 (2017).
625. Machado Bergamaschi, M., Helena Costa Queiroz, R., Waldo Zuadi, A. & Alexandre S. Crippa, J. Safety and Side Effects of Cannabidiol, a Cannabis sativa Constituent. *Curr. Drug Saf.* **6**, 237–249 (2011).
626. Huestis, M. A. *et al.* Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. *Curr. Neuropharmacol.* **17**, 974–989 (2019).
627. North, W. A., Khan, A. M., Yamase, H. T. & Sporn, J. R. Reversible granulocytopenia in association with riluzole therapy. *Ann. Pharmacother.* **34**, 322–324 (2000).
628. Bensimon, G. & Doble, A. The tolerability of riluzole in the treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin. Drug Saf.* **3**, 525–534 (2004).
629. Khan, A. J. *et al.* The glutamate release inhibitor riluzole increases DNA damage and enhances cytotoxicity in human glioma cells, in vitro and in vivo. *Oncotarget* **10**, 2824–2834 (2019).
630. Liu, Z. *et al.* Riluzole blocks HU210-facilitated ventral tegmental long-term depression by enhancing glutamate uptake in astrocytes. *Neurosci. Lett.* **704**, 201–207 (2019).
631. Liu, B. S., Ferreira, R., Lively, S. & Schlichter, L. C. Microglial SK3 and SK4 currents and activation state are modulated by the neuroprotective drug, riluzole. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **8**, 227–237 (2013).
632. Gilgun-Sherki, Y., Panet, H., Melamed, E. & Offen, D. Riluzole suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: Implications for the treatment of multiple sclerosis. *Brain Res.* **989**, 196–204 (2003).
633. Yoshizumi, M., Eisenach, J. C. & Hayashida, K. Riluzole and gabapentinoids activate glutamate transporters to facilitate glutamate-induced glutamate release from cultured astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **677**, 87–92 (2012).
634. Pertwee, R. G. *et al.* Cannabidiolic acid methyl ester, a stable synthetic analogue of cannabidiolic acid, can produce 5-HT1A receptor-mediated suppression of nausea and anxiety in rats. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 100–112 (2018).
635. Liddelow, S. A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481–487 (2017).
636. Bissaro, M. & Moro, S. Rethinking to riluzole mechanism of action: the molecular link among protein kinase CK1 $\delta$  activity, TDP-43 phosphorylation, and amyotrophic lateral sclerosis pharmacological treatment. *Neural Regen. Res.* **14**, 2083 (2019).
637. Bissaro, M. *et al.* Targeting Protein Kinase CK1 $\delta$  with Riluzole: Could It Be One of the Possible Missing Bricks to Interpret Its Effect in the Treatment of ALS from a Molecular Point of View? *ChemMedChem* **13**, 2601–2605 (2018).
638. Nakatogawa, H. Hrr25: An emerging major player in selective autophagy regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* **11**, 432–433 (2015).
639. Martínez-González, L. *et al.* Motor neuron preservation and decrease of in vivo TDP-43 phosphorylation by protein CK-1 $\delta$  kinase inhibitor treatment. *Sci. Rep.* **10**, 1–12 (2020).
640. Lehtonen, M., Reisner, K., Auriola, S., Wong, G. & Callaway, J. C. Mass-Spectrometric Identification of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Nematodes. *Chem. Biodivers.* **5**, 2431–2441 (2008).
641. Kim, H., Rogers, M. J., Richmond, J. E. & McIntire, S. L. SNF-6 is an acetylcholine transporter interacting with the dystrophin complex in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **430**, 891–896 (2004).
642. Leyva-Leyva, M., Sandoval, A., Felix, R. & González-Ramírez, R. Biochemical and Functional Interplay Between Ion Channels and the Components of the Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex. *J. Membr. Biol.* **251**, 535–550 (2018).
643. de Carvalho, M., Poliakov, A., Tavares, C. & Swash, M. Interplay of upper and lower motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* **128**, 2200–2204 (2017).
644. de Carvalho, M., Turkman, A. & Swash, M. Motor unit firing in amyotrophic lateral sclerosis and other upper and lower motor neurone disorders. *Clin. Neurophysiol.* **123**, 2312–2318 (2012).
645. Dong, Y., Wu, T., Hu, X. & Wang, T. Efficacy and safety of botulinum toxin type A for upper limb spasticity after stroke or traumatic brain injury: A systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Eur. J. Phys. Rehabil. Med.* **53**, 256–267 (2017).
646. Megeney, L. A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E. & Rudnicki, M. A. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev.* **10**, 1173–1183 (1996).
647. Vogels, O. J. M., Veltman, J., Oyen, W. J. G. & Horstink, M. W. I. M. Decreased striatal dopamine D2 receptor binding in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and multiple system atrophy (MSA): D2 receptor down-regulation versus striatal cell degeneration. *J. Neurol. Sci.* **180**, 62–65 (2000).
648. Borasio, G. D. *et al.* Dopaminergic deficit in amyotrophic lateral sclerosis assessed with [ $^{123}$ I] IPT single photon emission computed tomography. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **65**, 263–265 (1998).
649. Milan, L., Barrière, G., De Deurwaerdère, P., Cazalets, J. R. & Bertrand, S. S. Monoaminergic control of spinal locomotor networks in SOD1G93A newborn mice. *Front. Neural Circuits* **8**, 1–11 (2014).
650. Sandyk, R. *Serotonergic mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. International Journal of Neuroscience* vol. 116 (2006).
651. Vermeiren, Y., Janssens, J., Van Dam, D. & De Deyn, P. P. Serotonergic dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease: Similar mechanisms, dissimilar outcomes. *Front. Neurosci.* **12**, 1–9 (2018).
652. Zhang, Y. *et al.* The dual functions of the extreme N-terminus of TDP-43 in regulating its biological activity and inclusion formation. **22**, 3112–3122 (2013).
653. Chang, C. *et al.* The N-terminus of TDP-43 promotes its oligomerization and enhances DNA binding affinity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 219–224 (2012).
654. Tsoi, P. S. *et al.* The N-Terminal Domain of ALS-Linked TDP-43 Assembles without Misfolding. *Angew. Chemie Int. Ed.* **56**, 12590–12593 (2017).
655. Gao, F., Almeida, S. & Lopez-Gonzalez, R. Dysregulated molecular pathways in amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia spectrum disorder. *EMBO J.* **36**,



- 2931–2950 (2017).
656. Baradaran-Heravi, Y., Van Broeckhoven, C. & van der Zee, J. Stress granule mediated protein aggregation and underlying gene defects in the FTD-ALS spectrum. *Neurobiol. Dis.* **134**, 104639 (2020).
  657. Lee, S. & Huang, E. J. Modeling ALS and FTD with iPSC-derived neurons. *Brain Res.* **1656**, 88–97 (2017).
  658. Dringen, R., Pfeiffer, B. & Hamprecht, B. *Synthesis of the Antioxidant Glutathione in Neurons: Supply by Astrocytes of CysGly as Precursor for Neuronal Glutathione.* (1999).
  659. Rosenblum, L. T. *et al.* Mutation of the caspase-3 cleavage site in the astroglial glutamate transporter EAAT2 delays disease progression and extends lifespan in the SOD1-G93A mouse model of ALS. *Exp. Neurol.* **292**, 145–153 (2017).
  660. Rojas, F., Cortes, N., Abarzua, S., Dyrdar, A. & van Zundert, B. Astrocytes expressing mutant SOD1 and TDP43 trigger motoneuron death that is mediated via sodium channels and nitroxidative stress. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, (2014).
  661. Qian, K. *et al.* Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports* **8**, 843–855 (2017).
  662. Weydt, P., Yuen, E. C., Ransom, B. R. & Möller, T. Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice. *Glia* **48**, 179–182 (2004).
  663. Frakes, A. E. *et al.* Microglia induce motor neuron death via the classical NF- $\kappa$ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **81**, 1009–1023 (2014).
  664. Spiller, K. J. *et al.* Microglia-mediated recovery from ALS-relevant motor neuron degeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathy. *Nat. Neurosci.* **21**, 329–340 (2018).
  665. Ferraiuolo, L. *et al.* Oligodendrocytes contribute to motor neuron death in ALS via SOD1-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E6496–E6505 (2016).
  666. Nishihira, Y. *et al.* Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. *Acta Neuropathol.* **116**, 169–182 (2008).
  667. Milligan, G. G Protein-Coupled Receptor Dimerization: Function and Ligand Pharmacology. *Mol. Pharmacol.* **66**, 1–7 (2004).
  668. Yekkirala, A. S. Two to tango: GPCR oligomers and GPCR-TRP channel interactions in nociception. *Life Sci.* **92**, 438–445 (2013).
  669. Birdsall, N. J. M. Class A GPCR heterodimers: evidence from binding studies. *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 499–508 (2010).
  670. Bonaventura, J. *et al.* L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A2A adenosine–CB1 cannabinoid–D2 dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus. *Neuropharmacology* **79**, 90–100 (2014).
  671. Mollica, A. *et al.* Exploring the first Rimonabant analog-opioid peptide hybrid compound, as bivalent ligand for CB1 and opioid receptors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32**, 444–451 (2017).
  672. Glass, M. & Felder, C. C. Concurrent Stimulation of Cannabinoid CB1 and Dopamine D2 Receptors Augments cAMP Accumulation in Striatal Neurons: Evidence for a G s Linkage to the CB1 Receptor. *J. Neurosci.* **17**, 5327–5333 (1997).
  673. Przybyla, J. A. & Watts, V. J. Ligand-Induced Regulation and Localization of Cannabinoid CB 1 and Dopamine D 2L Receptor Heterodimers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **332**, 710–719 (2010).
  674. Navarro, G. *et al.* Detection of Heteromers Formed by Cannabinoid CB 1, Dopamine D 2, and Adenosine A 2A G-Protein-Coupled Receptors by Combining Bimolecular Fluorescence Complementation and Bioluminescence Energy Transfer. *Sci. World J.* **8**, 1088–1097 (2008).
  675. Carriba, P. *et al.* Striatal Adenosine A2A and Cannabinoid CB1 Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* **32**, 2249–2259 (2007).
  676. Hojo, M. *et al.*  $\mu$ -Opioid Receptor Forms a Functional Heterodimer With Cannabinoid CB1 Receptor: Electrophysiological and FRET Assay Analysis. *J. Pharmacol. Sci.* **108**, 308–319 (2008).
  677. Christie, M. J. Opioid and cannabinoid receptors: friends with benefits or just close friends? *Br. J. Pharmacol.* **148**, 385–386 (2009).
  678. Tóth, A. D., Turu, G., Hunyady, L. & Balla, A. Novel mechanisms of G-protein-coupled receptors functions: AT1 angiotensin receptor acts as a signaling hub and focal point of receptor cross-talk. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **32**, 69–82 (2018).
  679. Perrey, D. A., Gilmour, B. P., Thomas, B. F. & Zhang, Y. Toward the Development of Bivalent Ligand Probes of Cannabinoid CB1 and Orexin OX1 Receptor Heterodimers. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 634–638 (2014).
  680. Berrendero, F., Flores, Á. & Robledo, P. When orexins meet cannabinoids: Bidirectional functional interactions. *Biochem. Pharmacol.* **157**, 43–50 (2018).
  681. Ellis, J., Pediani, J. D., Canals, M., Milasta, S. & Milligan, G. Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J. Biol. Chem.* **281**, 38812–38824 (2006).
  682. Flores, Á., Maldonado, R. & Berrendero, F. Cannabinoid-hypocretin cross-talk in the central nervous system: what we know so far. *Front. Neurosci.* **7**, (2013).
  683. Galindo, L. *et al.* Cannabis Users Show Enhanced Expression of CB1-5HT2A Receptor Heteromers in Olfactory Neuroepithelium Cells. *Mol. Neurobiol.* **55**, 6347–6361 (2018).
  684. Martínez-Pinilla, E. *et al.* CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum. *Exp. Neurol.* **261**, 44–52 (2014).
  685. Scarlett, K. A. *et al.* Agonist-induced CXCR4 and CB2 Heterodimerization Inhibits Ga13/RhoA-mediated Migration. *Mol. Cancer Res.* **16**, 728–739 (2018).
  686. Moreno, E., Cavic, M., Krivokuca, A., Casadó, V. & Canela, E. The Endocannabinoid System as a Target in Cancer Diseases: Are We There Yet? *Front. Pharmacol.* **10**, (2019).
  687. Balenga, N. A. *et al.* Heteromerization of GPR55 and cannabinoid CB 2 receptors modulates signalling. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 5387–5406 (2014).
  688. Bonhaus, D. W., Chang, L. K., Kwan, J. & Martin, G. R. Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: Evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **287**, 884–888 (1998).
  689. Demuth, D. G. & Molleman, A. Cannabinoid signalling. *Life Sci.* **78**, 549–563 (2006).
  690. Maneuf, Y. P. & Brothchie, J. M. Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 1397–1398 (1997).
  691. Brown, S. P., Safo, P. K. & Regehr, W. G. Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J. Neurosci.* **24**, 5623–5631 (2004).
  692. Fisyunov, A., Tsintsadze, V., Min, R., Burnashev, N. & Lozovaya, N. Cannabinoids modulate the P-type high-voltage-activated calcium currents in Purkinje neurons. *J. Neurophysiol.* **96**, 1267–1277 (2006).
  693. Twitchell, W., Brown, S. & Mackie, K. Cannabinoids inhibit n- and p/q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* **78**, 43–50 (1997).
  694. Guo, J. & Ikeda, S. R. Endocannabinoids Modulate N-Type Calcium Channels and G-Protein-Coupled Inwardly Rectifying Potassium Channels via CB1 Cannabinoid Receptors Heterologously Expressed in Mammalian Neurons. *Mol. Pharmacol.* **65**, 665–674 (2004).
  695. Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J. & Manzoni, O. J. Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J. Neurosci.* **21**, 109–116 (2001).
  696. Turu, G. & Hunyady, L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of Molecular Endocrinology* vol. 44 75–85 (2010).
  697. Howlett, A., Blume, L. & Dalton, G. CB1 Cannabinoid Receptors and their Associated Proteins. *Curr. Med. Chem.* **17**, 1382–1393 (2010).
  698. Gomez, O. *et al.* Cannabinoid receptor agonists modulate oligodendrocyte differentiation by activating PI3K/Akt and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 1520–1532 (2011).
  699. Saroz, Y., Kho, D. T., Glass, M., Graham, E. S. & Grimsey, N. L. Cannabinoid Receptor 2 (CB 2) Signals via G-alpha-s and Induces IL-6 and IL-10 Cytokine Secretion in Human Primary Leukocytes. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2**, 414–428 (2019).
  700. Bosier, B., Lambert, D. M. & Hermans, E. Reciprocal influences of CB 1 cannabinoid receptor agonists on ERK and JNK signalling in N1E-115 cells. *FEBS Lett.* **582**, 3861–3867 (2008).
  701. Bosier, B. & Hermans, E. Versatility of GPCR recognition by drugs: from biological implications to therapeutic relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 438–446 (2007).
  702. Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Elrick, D. B., Mechoulam, R. & Corbett, A. D. Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine. *Br. J. Pharmacol.* **105**, 980–4 (1992).
  703. Van Sickle, M. D. *et al.* Neuroscience: Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science (80-. )* **310**, 329–332 (2005).





# ANEXO

---



# Material suplementario

| Wildtype+vehículo Vs TDP43 <sup>A315T</sup> +vehículo |                     |                                  |            |                     |         |           |         | Wildtype+vehículo Vs TDP43 <sup>A315T</sup> +HU308 |                                |            |                     |         |           |         |  |
|---|---------------------|----------------------------------|------------|---------------------|---------|-----------|---------|--|--------------------------------|------------|---------------------|---------|-----------|---------|--|
| Días  | Wildtype + vehículo | TDP43 <sup>A315T</sup> +vehículo | Diferencia | 95% I.C. diferencia | t       | P valor   | Resumen | Wildtype +Vehículo                                 | TDP43 <sup>A315T</sup> + HU308 | Diferencia | 95% I.C. diferencia | t       | P valor   | Resumen |  |
| 65  | 100,0               | 100,0                            | 0,0000     | -5.530 to 5.530     | 0,0000  | P > 0.05  |         | 100,0  | 100,0                          | 0,0000     | -5.268 to 5.268     | 0,0000  | P > 0.05  | ns      |  |
| 66  | 101,6               | 101,0                            | -0,6310    | -6.161 to 4.899     | 0,3963  | P > 0.05  |         | 101,6  | 100,8                          | -0,7717    | -6.040 to 4.496     | 0,5087  | P > 0.05  |         |  |
| 67  | 104,1               | 102,8                            | -1,320     | -6.850 to 4.210     | 0,8291  | P > 0.05  |         | 104,1  | 101,7                          | -2,458     | -7.726 to 2.809     | 1,621   | P > 0.05  |         |  |
| 68  | 104,8               | 101,7                            | -3,116     | -8.646 to 2.414     | 1,957   | P > 0.05  |         | 104,8  | 99,61                          | -5,236     | -10.50 to 0.03224   | 3,451   | P < 0.05  |         |  |
| 69  | 105,0               | 104,2                            | -0,7861    | -6.316 to 4.744     | 0,4936  | P > 0.05  |         | 105,0  | 103,9                          | -1,107     | -6.375 to 4.161     | 0,7298  | P > 0.05  |         |  |
| 70  | 105,8               | 105,0                            | -0,7699    | -6.300 to 4.760     | 0,4835  | P > 0.05  |         | 105,8  | 105,3                          | -0,4645    | -5.732 to 4.803     | 0,3062  | P > 0.05  |         |  |
| 71  | 106,6               | 105,2                            | -1,433     | -6.963 to 4.097     | 0,8996  | P > 0.05  |         | 106,6  | 105,3                          | -1,349     | -6.617 to 3.919     | 0,8892  | P > 0.05  |         |  |
| 72  | 103,6               | 103,1                            | -0,4893    | -6.019 to 5.041     | 0,3072  | P > 0.05  |         | 103,6  | 102,2                          | -1,386     | -6.654 to 3.882     | 0,9138  | P > 0.05  |         |  |
| 73  | 105,3               | 105,6                            | 0,3363     | -5.194 to 5.866     | 0,2112  | P > 0.05  |         | 105,3  | 105,2                          | -0,1455    | -5.413 to 5.122     | 0,09590 | P > 0.05  |         |  |
| 74  | 106,6               | 106,4                            | -0,1703    | -5.700 to 5.360     | 0,1069  | P > 0.05  |         | 106,6  | 105,5                          | -1,127     | -6.395 to 4.140     | 0,7432  | P > 0.05  |         |  |
| 75  | 107,0               | 106,1                            | -0,9161    | -6.446 to 4.614     | 0,5753  | P > 0.05  | ns      | 107,0  | 105,7                          | -1,319     | -6.586 to 3.949     | 0,8693  | P > 0.05  | ns      |  |
| 76  | 107,8               | 106,7                            | -1,145     | -6.675 to 4.385     | 0,7188  | P > 0.05  |         | 107,8  | 106,7                          | -1,099     | -6.366 to 4.169     | 0,7242  | P > 0.05  |         |  |
| 77  | 107,9               | 106,2                            | -1,738     | -7.268 to 3.792     | 1,091   | P > 0.05  |         | 107,9  | 107,3                          | -0,6303    | -5.898 to 4.638     | 0,4155  | P > 0.05  |         |  |
| 78  | 108,2               | 106,5                            | -1,710     | -7.240 to 3.820     | 1,074   | P > 0.05  |         | 108,2  | 107,2                          | -1,043     | -6.311 to 4.225     | 0,6874  | P > 0.05  |         |  |
| 79  | 106,4               | 107,0                            | 0,5781     | -4.952 to 6.108     | 0,3630  | P > 0.05  |         | 106,4  | 106,2                          | -0,2109    | -5.479 to 5.057     | 0,1390  | P > 0.05  |         |  |
| 80  | 108,0               | 108,2                            | 0,2307     | -5.299 to 5.761     | 0,1449  | P > 0.05  |         | 108,0  | 106,7                          | -1,315     | -6.583 to 3.953     | 0,8668  | P > 0.05  |         |  |
| 81  | 108,5               | 108,5                            | -0,01791   | -5.548 to 5.512     | 0,01124 | P > 0.05  |         | 108,5  | 107,1                          | -1,400     | -6.668 to 3.868     | 0,9231  | P > 0.05  |         |  |
| 82  | 108,8               | 108,6                            | -0,2188    | -5.749 to 5.311     | 0,1374  | P > 0.05  |         | 108,8  | 108,4                          | -0,4350    | -5.703 to 4.833     | 0,2868  | P > 0.05  |         |  |
| 83  | 109,6               | 109,4                            | -0,1888    | -5.719 to 5.341     | 0,1185  | P > 0.05  |         | 109,6  | 107,6                          | -1,994     | -7.261 to 3.274     | 1,314   | P > 0.05  |         |  |
| 84  | 109,5               | 108,5                            | -1,022     | -6.552 to 4.508     | 0,6418  | P > 0.05  |         | 109,5  | 107,6                          | -1,900     | -7.168 to 3.368     | 1,252   | P > 0.05  |         |  |
| 85  | 110,3               | 109,2                            | -1,046     | -6.576 to 4.484     | 0,6569  | P > 0.05  | ***     | 110,3  | 107,0                          | -3,240     | -8.507 to 2.028     | 2,136   | P > 0.05  | ***     |  |
| 86  | 108,1               | 107,8                            | -0,3320    | -5.862 to 5.198     | 0,2085  | P > 0.05  |         | 108,1  | 105,0                          | -3,101     | -8.369 to 2.166     | 2,044   | P > 0.05  |         |  |
| 87  | 109,8               | 109,0                            | -0,7550    | -6.285 to 4.775     | 0,4741  | P > 0.05  |         | 109,8  | 107,1                          | -2,672     | -7.939 to 2.596     | 1,761   | P > 0.05  |         |  |
| 88  | 110,6               | 109,0                            | -1,560     | -7.090 to 3.970     | 0,9798  | P > 0.05  |         | 110,6  | 106,7                          | -3,879     | -9.147 to 1.389     | 2,557   | P > 0.05  |         |  |
| 89  | 110,7               | 108,1                            | -2,541     | -8.071 to 2.989     | 1,596   | P > 0.05  |         | 110,7  | 107,1                          | -3,593     | -8.861 to 1.675     | 2,368   | P > 0.05  |         |  |
| 90  | 111,8               | 107,8                            | -3,992     | -9.522 to 1.538     | 2,507   | P > 0.05  |         | 111,8  | 106,6                          | -5,242     | -10.51 to 0.02534   | 3,456   | P < 0.05  |         |  |
| 91  | 112,0               | 107,5                            | -4,541     | -10.07 to 0.9890    | 2,852   | P > 0.05  |         | 112,0  | 105,5                          | -6,473     | -11.74 to -1.205    | 4,267   | P < 0.001 |         |  |
| 92  | 112,4               | 106,7                            | -5,727     | -11.26 to -0.1973   | 3,597   | P < 0.05  |         | 112,4  | 104,6                          | -7,797     | -13.06 to -2.529    | 5,140   | P < 0.001 |         |  |
| 93  | 109,8               | 104,2                            | -5,632     | -11.16 to -0.1024   | 3,537   | P < 0.05  |         | 109,8  | 104,2                          | -5,619     | -10.89 to -0.3511   | 3,704   | P < 0.01  |         |  |
| 94  | 111,6               | 103,6                            | -7,919     | -13.45 to -2.389    | 4,973   | P < 0.001 |         | 111,6  | 104,2                          | -7,390     | -12.66 to -2.122    | 4,872   | P < 0.001 |         |  |
| 95  | 112,4               | 103,3                            | -9,141     | -14.67 to -3.611    | 5,740   | P < 0.001 |         | 112,4  | 103,1                          | -9,372     | -14.64 to -4.104    | 6,178   | P < 0.001 |         |  |

**Tabla S1. Control de peso diario durante el periodo de tratamiento. Los datos se representan como la media ± SEM del porcentaje de peso respecto al peso inicial de cada grupo experimental.** Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para valores repetidos, seguido de un test de Bonferroni. \*p<0.05 (\* respecto a los animales WT+vehículo). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (\* respecto a los animales WT + Vehículo)

| Wildtype Vs TDP43 <sup>A315T</sup> |          |                        |            |                     |        |          |         | Wildtype Vs TDP43 <sup>A315T</sup> ; Cnr2 <sup>-/-</sup> |   |            |                     |       |          |         |  |
|------------------------------------|----------|------------------------|------------|---------------------|--------|----------|---------|--|---|------------|---------------------|-------|----------|---------|--|
| Semanas                            | Wildtype | TDP43 <sup>A315T</sup> | Diferencia | 95% I.C. diferencia | t      | P valor  | Resumen | Wildtype   | TDP43 <sup>A315T</sup> ;Cnr2 <sup>-/-</sup> | Diferencia | 95% I.C. diferencia | t     | P valor  | Resumen |  |
| 4                                  | 10,55    | 8,918                  | -1,634     | -5.313 to 2.046     | 1,544  | P > 0.05 | ns      | 10,55  | 6,604                                       | -3,948     | -7.627 to -0.2682   | 3,730 | P<0.01   | **      |  |
| 5                                  | 9,933    | 9,608                  | -0,3258    | -4.248 to 3.596     | 0,2888 | P > 0.05 |         | 9,933  | 6,962                                       | -2,971     | -6.651 to 0.7081    | 2,808 | P > 0.05 | ns      |  |
| 6                                  | 14,45    | 13,07                  | -1,379     | -5.059 to 2.300     | 1,303  | P > 0.05 |         | 14,45  | 10,56                                       | -3,893     | -7.573 to -0.2139   | 3,679 | P<0.01   | **      |  |
| 7                                  | 16,92    | 16,25                  | -0,6753    | -4.355 to 3.004     | 0,6381 | P > 0.05 |         | 16,92  | 13,95                                       | -2,975     | -6.655 to 0.7041    | 2,811 | P > 0.05 | ns      |  |
| 8                                  | 20,58    | 19,13                  | -1,448     | -5.128 to 2.231     | 1,368  | P > 0.05 |         | 20,58  | 17,29                                       | -3,288     | -6.968 to 0.3911    | 3,107 | P < 0.05 | *       |  |
| 9                                  | 22,60    | 20,12                  | -2,478     | -6.157 to 1.202     | 2,341  | P > 0.05 |         | 22,60  | 19,50                                       | -3,100     | -6.779 to 0.5798    | 2,929 | P > 0.05 | ns      |  |
| 10                                 | 24,23    | 19,67                  | -4,553     | -8.232 to -0.8735   | 4,302  | P<0.001  |         | 24,23  | 20,14                                       | -4,081     | -7.760 to -0.4015   | 3,856 | P<0.01   | **      |  |
| 11                                 | 25,37    | 21,78                  | -3,588     | -7.267 to 0.09147   | 3,390  | P < 0.05 |         | 25,37  | 20,66                                       | -4,706     | -8.385 to -1.027    | 4,447 | P<0.001  | ***     |  |
| 12                                 | 25,15    | 22,01                  | -3,144     | -6.823 to 0.5358    | 2,970  | P < 0.05 |         | 25,15  | 21,15                                       | -4,002     | -7.681 to -0.3222   | 3,781 | P<0.01   | **      |  |
| 13                                 | 26,36    | 22,48                  | -3,879     | -7.558 to -0.1992   | 3,665  | P<0.01   |         | 26,36  | 21,46                                       | -4,901     | -8.580 to -1.221    | 4,631 | P<0.001  | ***     |  |
| 14                                 | 26,84    | 22,58                  | -4,262     | -7.941 to -0.5822   | 4,027  | P<0.01   | **      | 26,84  | 21,11                                       | -5,736     | -9.415 to -2.056    | 5,420 | P<0.001  |         |  |
| 15                                 | 27,47    | 22,45                  | -5,017     | -8.939 to -1.094    | 4,447  | P<0.001  | ***     | 27,47  | 21,72                                       | -5,747     | -9.426 to -2.067    | 5,430 | P<0.001  |         |  |
| 16                                 | 26,84    | 22,92                  | -3,925     | -8.001 to 0.1512    | 3,348  | P < 0.05 | *       | 26,84  | 22,20                                       | -4,640     | -8.483 to -0.7969   | 4,198 | P<0.001  |         |  |
| 17                                 | 28,12    | 23,40                  | -4,717     | -9.154 to -0.2791   | 3,695  | P<0.01   | **      | 28,12  | 22,51                                       | -5,606     | -9.449 to -1.763    | 5,071 | P<0.001  |         |  |

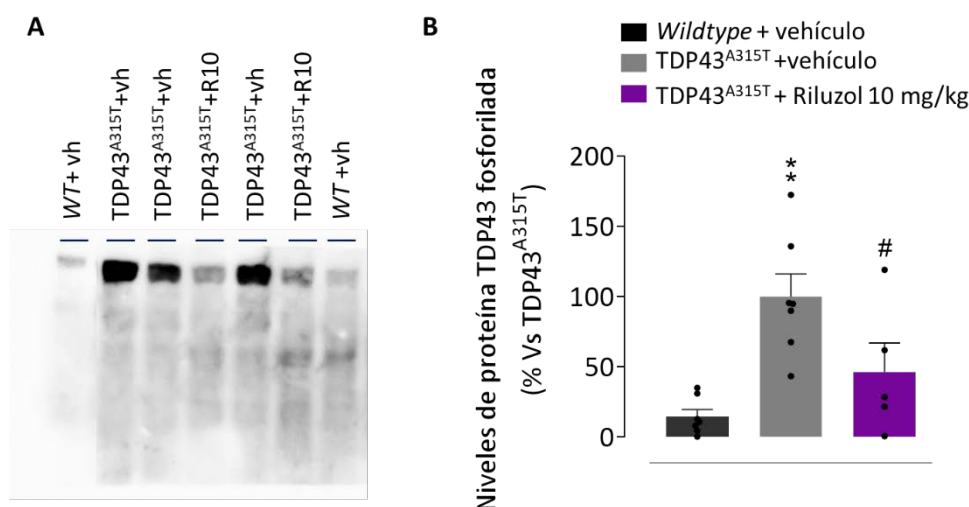
**Tabla S2. Control de peso diario durante el periodo de tratamiento. Los datos se representan como la media ± SEM del peso cada grupo experimental.** Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para valores repetidos, seguido de un test de Bonferroni. \*p<0.05 (\* respecto a los animales WT+vehículo). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (\* respecto a los animales WT+Vehículo)

| Wildtype +Vh Vs TDP43 <sup>A315T</sup> +Vh           |               |                                |            |                     |        |           |         | Wildtype +Vh Vs TDP43 <sup>A315T</sup> +CBDA 0,1mg/kg |                                  |            |                     |       |          |         |  |
|--|---------------|--------------------------------|------------|---------------------|--------|-----------|---------|---|----------------------------------|------------|---------------------|-------|----------|---------|--|
| Días   | Wildtype +v/h | TP43 <sup>A315T</sup> +v/h     | Diferencia | 95% I.C. diferencia | t      | P valor   | Resumen | Wildtype +v/h   | TDP43 <sup>A315T</sup> +CBDA 0,1 | Diferencia | 95% I.C. diferencia | t     | P valor  | Resumen |  |
| 65   | 23,3          | 20,82                          | -2,482     | -5.221 to 0.2575    | 3,378  | P < 0.05  | *       | 23,30   | 21,15                            | -2,145     | -4.885 to 0.5938    | 2,920 | P > 0.05 | ns      |  |
| 66   | 24,03         | 21,36                          | -2,663     | -5.402 to 0.07647   | 3,624  | P<0.01    | **      | 24,03   | 21,82                            | -2,208     | -4.948 to 0.5310    | 3,005 | P > 0.05 | ns      |  |
| 67   | 24,08         | 21,39                          | -2,691     | -5.431 to 0.04786   | 3,663  | P<0.01    | **      | 24,08   | 21,97                            | -2,110     | -4.849 to 0.6297    | 2,871 | P > 0.05 | ns      |  |
| 68   | 24,2          | 21,1                           | -3,1       | -5.839 to -0.3607   | 4,219  | P<0.001   | ***     | 24,20   | 21,83                            | -2,373     | -5.112 to 0.3666    | 3,229 | P < 0.05 | *       |  |
| 69   | 24,07         | 21,25                          | -2,813     | -5.552 to -0.07380  | 3,828  | P<0.01    | **      | 24,07   | 22,06                            | -2,004     | -4.743 to 0.7353    | 2,727 | P > 0.05 | ns      |  |
| 70   | 24,34         | 21,14                          | -3,199     | -5.938 to -0.4596   | 4,354  | P<0.001   | ***     | 24,34   | 22,09                            | -2,244     | -4.984 to 0.4949    | 3,054 | P > 0.05 | ns      |  |
| 71   | 24,35         | 21,14                          | -3,218     | -5.968 to -0.4688   | 4,364  | P<0.001   | ***     | 24,35   | 22,21                            | -2,145     | -4.895 to 0.6040    | 2,909 | P > 0.05 | ns      |  |
| 72   | 23,71         | 21,32                          | -2,386     | -5.227 to 0.4550    | 3,131  | P < 0.05  | *       | 23,71   | 21,61                            | -2,096     | -4.937 to 0.7450    | 2,750 | P > 0.05 | ns      |  |
| 73   | 24,3          | 21,35                          | -2,95      | -5.791 to -0.1091   | 3,871  | P<0.01    | **      | 24,30   | 22,15                            | -2,155     | -4.894 to 0.5848    | 2,932 | P > 0.05 | ns      |  |
| 74   | 24,46         | 21,63                          | -2,829     | -5.670 to 0.01208   | 3,712  | P<0.01    | **      | 24,46   | 22,08                            | -2,377     | -5.116 to 0.3623    | 3,235 | P < 0.05 | *       |  |
| 75   | 24,67         | 21,41                          | -3,258     | -6.099 to -0.4167   | 4,275  | P<0.001   | ***     | 24,67   | 22,07                            | -2,595     | -5.334 to 0.1444    | 3,532 | P < 0.05 | *       |  |
| 76   | 24,77         | 21,63                          | -3,138     | -5.979 to -0.2967   | 4,117  | P<0.01    | **      | 24,77   | 21,87                            | -2,895     | -5.634 to -0.1556   | 3,940 | P<0.01   | **      |  |
| 77   | 24,77         | 21,38                          | -3,394     | -6.234 to -0.5526   | 4,453  | P<0.001   | ***     | 24,77   | 22,26                            | -2,510     | -5.249 to 0.2294    | 3,416 | P < 0.05 | *       |  |
| 78   | 24,9          | 21,2                           | -3,697     | -6.538 to -0.8562   | 4,851  | P<0.001   | ***     | 24,90   | 21,68                            | -3,215     | -5.955 to -0.4759   | 4,376 | P<0.001  | *       |  |
| 79   | 24,26         | 21,37                          | -2,892     | -5.853 to 0.06819   | 3,642  | P<0.01    | **      | 24,26   | 21,18                            | -3,077     | -5.816 to -0.3377   | 4,188 | P<0.001  | *       |  |
| 80   | 25            | 21,4                           | -3,6       | -6.560 to -0.6396   | 4,534  | P<0.001   | ***     | 25,00   | 21,85                            | -3,150     | -5.991 to -0.3091   | 4,134 | P<0.001  | ***     |  |
| 81   | 25,09         | 22                             | -3,091     | -6.194 to 0.01203   | 3,714  | P<0.01    | **      | 25,09   | 21,42                            | -3,671     | -6.512 to -0.8303   | 4,818 | P<0.001  | ***     |  |
| 82   | 25,13         | 21,96                          | -3,164     | -6.267 to -0.06077  | 3,801  | P<0.01    | ***     | 25,13   | 21,32                            | -3,806     | -6.647 to -0.9656   | 4,995 | P<0.001  | ***     |  |
| 83   | 25,44         | 21,55                          | -3,885     | -6.988 to -0.7821   | 4,668  | P<0.001   | ***     | 25,44   | 21,57                            | -3,865     | -6.706 to -1.024    | 5,072 | P<0.001  | ***     |  |
| 84   | 25,49         | 21,56                          | -3,932     | -7.035 to -0.8284   | 4,723  | P<0.001   | ***     | 25,49   | 22,50                            | -2,994     | -6.097 to 0.1091    | 3,597 | P<0.01   | **      |  |
| 85   | 25,44         | 21,83                          | -3,61      | -6.887 to -0.3319   | 4,106  | P<0.01    | **      | 25,44   | 22,54                            | -2,901     | -6.004 to 0.2025    | 3,485 | P < 0.05 | *       |  |
| 86   | 25,01         | 21,73                          | -3,277     | -6.830 to 0.2753    | 3,439  | P < 0.05  | *       | 25,01   | 22,05                            | -2,961     | -6.127 to 0.2052    | 3,486 | P < 0.05 | *       |  |
| 87   | 25,73         | 21,72                          | -4,012     | -7.565 to -0.4592   | 4,21   | P<0.001   | ***     | 25,73   | 22,39                            | -3,341     | -6.507 to -0.1752   | 3,934 | P<0.01   | **      |  |
| 88   | 25,75         | 21,57                          | -4,183     | -7.736 to -0.6307   | 4,39   | P<0.001   | ***     | 25,75   | 21,85                            | -3,900     | -7.066 to -0.7341   | 4,592 | P<0.001  | ***     |  |
| 89   | 25,53         | 21,05                          | -4,475     | -8.028 to -0.9223   | 4,696  | P<0.001   | ***     | 25,53   | 21,45                            | -4,075     | -7.241 to -0.9091   | 4,799 | P<0.001  | ***     |  |
| Wildtype +v/h Vs TDP43 <sup>A315T</sup> +CBDA 1mg/kg |               |                                |            |                     |        |           |         | Wildtype +v/h Vs TDP43 <sup>A315T</sup> +CBDA 10mg/kg |                                  |            |                     |       |          |         |  |
| Días   | Wildtype +v/h | TDP43 <sup>A315T</sup> +CBDA 1 | Diferencia | 95% I.C. diferencia | t      | P valor   | Resumen | Wildtype +v/h   | TDP43 <sup>A315T</sup> +CBDA 10  | Diferencia | 95% I.C. diferencia | t     | P valor  | Resumen |  |
| 65   | 23,30         | 22,65                          | -0,6500    | -3.491 to 2.191     | 0,8530 | P > 0.05  | ns      | 23,30   | 21,86                            | -1,443     | -4.721 to 1.835     | 1,641 | P > 0.05 | ns      |  |
| 66   | 24,03         | 23,03                          | -0,9965    | -3.837 to 1.844     | 1,308  |           |         | 24,03   | 22,49                            | -1,541     | -4.818 to 1.737     | 1,752 |          |         |  |
| 67   | 24,08         | 23,09                          | -0,9924    | -3.833 to 1.849     | 1,302  |           |         | 24,08   | 22,54                            | -1,539     | -4.817 to 1.738     | 1,751 |          |         |  |
| 68   | 24,20         | 23,33                          | -0,8700    | -3.711 to 1.971     | 1,142  |           |         | 24,20   | 22,37                            | -1,829     | -5.106 to 1.449     | 2,080 |          |         |  |
| 69   | 24,07         | 22,86                          | -1,208     | -4.049 to 1.633     | 1,585  |           |         | 24,07   | 22,59                            | -1,482     | -4.760 to 1.796     | 1,686 |          |         |  |
| 70   | 24,34         | 23,06                          | -1,275     | -4.116 to 1.566     | 1,674  | P < 0.05  | *       | 24,34   | 22,84                            | -1,492     | -4.770 to 1.785     | 1,697 | P < 0.05 | *       |  |
| 71   | 24,35         | 23,38                          | -0,9768    | -3.946 to 1.993     | 1,226  |           |         | 24,35   | 22,77                            | -1,583     | -4.869 to 1.703     | 1,796 |          |         |  |
| 72   | 23,71         | 22,45                          | -1,256     | -4.097 to 1.585     | 1,648  | P < 0.01  | **      | 23,71   | 22,28                            | -1,423     | -4.919 to 2.074     | 1,517 | P < 0.01 | **      |  |
| 73   | 24,30         | 22,78                          | -1,520     | -4.361 to 1.321     | 1,995  |           |         | 24,30   | 23,00                            | -1,300     | -4.578 to 1.978     | 1,479 |          |         |  |
| 74   | 24,46         | 22,35                          | -2,109     | -4.950 to 0.7321    | 2,767  | P > 0.05  | ns      | 24,46   | 22,99                            | -1,473     | -4.751 to 1.805     | 1,675 | P > 0.05 | ns      |  |
| 75   | 24,67         | 22,19                          | -2,478     | -5.319 to 0.3633    | 3,251  |           |         | 24,67   | 23,10                            | -1,568     | -4.845 to 1.710     | 1,783 |          |         |  |
| 76   | 24,77         | 22,06                          | -2,708     | -5.549 to 0.1333    | 3,553  | P<0.01    | **      | 24,77   | 23,19                            | -1,582     | -4.860 to 1.696     | 1,799 | P<0.01   | **      |  |
| 77   | 24,77         | 21,80                          | -2,974     | -5.814 to -0.1326   | 3,902  |           |         | 24,77   | 23,10                            | -1,674     | -4.951 to 1.604     | 1,903 |          |         |  |
| 78   | 24,90         | 22,39                          | -2,510     | -5.613 to 0.5936    | 3,015  | P > 0.05  | ns      | 24,90   | 23,13                            | -1,768     | -5.046 to 1.509     | 2,011 | P > 0.05 | ns      |  |
| 79   | 24,26         | 22,03                          | -2,230     | -5.508 to 1.047     | 2,537  |           |         | 24,26   | 22,47                            | -1,787     | -5.065 to 1.490     | 2,033 |          |         |  |
| 80   | 25,00         | 22,60                          | -2,400     | -5.897 to 1.097     | 2,559  | P < 0.05  | *       | 25,00   | 22,53                            | -2,471     | -5.749 to 0.8063    | 2,811 | P < 0.05 | *       |  |
| 81   | 25,09         | 22,17                          | -2,925     | -6.421 to 0.5724    | 3,118  |           |         | 25,09   | 22,46                            | -2,634     | -5.912 to 0.6437    | 2,996 |          |         |  |
| 82   | 25,13         | 21,82                          | -3,310     | -6.807 to 0.1871    | 3,529  | P < 0.001 | ***     | 25,13   | 22,31                            | -2,812     | -6.090 to 0.4655    | 3,199 | P<0.01   | **      |  |
| 83   | 25,44         | 21,30                          | -4,135     | -7.632 to -0.6384   | 4,409  |           |         | 25,44   | 22,11                            | -3,321     | -6.599 to -0.04328  | 3,777 |          |         |  |
| 84   | 25,49         | 21,35                          | -4,144     | -7.641 to -0.6472   | 4,418  | P > 0.05  | ns      | 25,49   | 22,11                            | -3,380     | -6.658 to -0.1021   | 3,844 | P > 0.05 | ns      |  |
| 85   | 25,44         | 21,02                          | -4,422     | -7.918 to -0.9247   | 4,714  |           |         | 25,44   | 22,72                            | -2,722     | -6.218 to 0.7753    | 2,901 |          |         |  |
| 86   | 25,01         | 22,00                          | -3,011     | -7.808 to 1.787     | 2,340  | P > 0.05  | ns      | 25,01   | 23,46                            | -1,551     | -5.385 to 2.283     | 1,508 | P > 0.05 | ns      |  |
| 87   | 25,73         | 21,93                          | -3,795     | -8.593 to 1.002     | 2,949  |           |         | 25,73   | 23,76                            | -1,969     | -5.803 to 1.866     | 1,914 |          |         |  |
| 88   | 25,75         | 21,97                          | -3,783     | -8.581 to 1.014     | 2,940  |           |         | 25,75   | 22,88                            | -2,870     | -6.704 to 0.9641    | 2,791 |          |         |  |
| 89   | 25,53         | 21,73                          | -3,792     | -8.589 to 1.006     | 2,946  |           |         | 25,53   | 22,84                            | -2,685     | -6.519 to 1.149     | 2,611 |          |         |  |

**Tabla S3. Control de peso diario durante el periodo de tratamiento. Los datos se representan como la media ± SEM del peso cada grupo experimental. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para valores repetidos, seguido de un test de Bonferroni. \*p<0.05 (\* respecto a los animales WT+vehículo). \*p<0.5; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (\* respecto a los animales WT+Vehículo)**

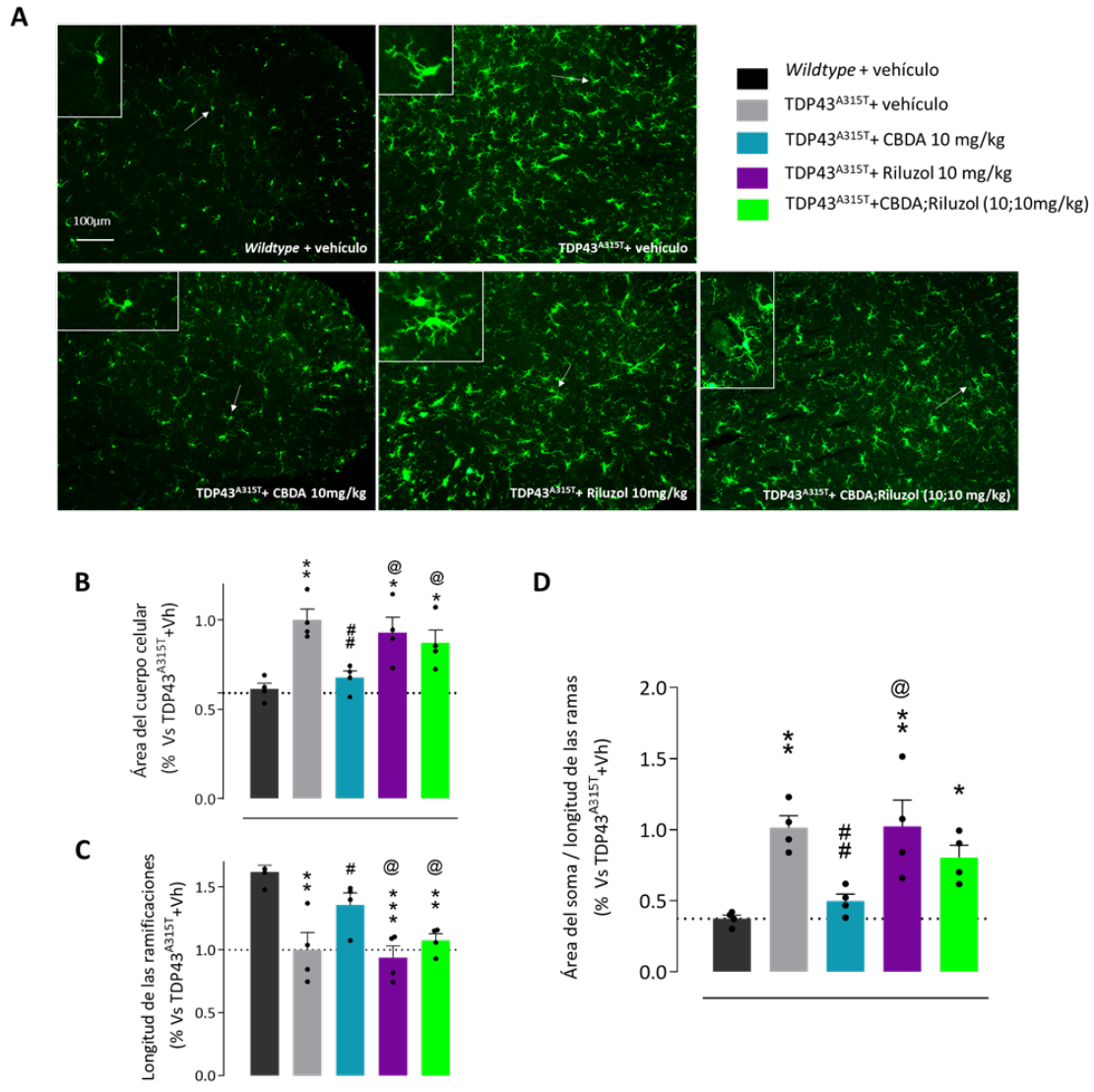
| Wildtype +vehículo Vs TDP43 <sup>A315T</sup> +vehículo        |                    |                                    |            |                     |         |          |         | Wildtype +vehículoVs TDP43 <sup>A315T</sup> +CBDA 10mg/kg    |                                     |                  |                     |          |          |         |  |
|---|--------------------|------------------------------------|------------|---------------------|---------|----------|---------|--|-------------------------------------|------------------|---------------------|----------|----------|---------|--|
| Días  | Wildtype +vehículo | TDP43 <sup>A315T</sup> +vehículo   | Diferencia | 95% I.C. diferencia | t       | P valor  | Resumen | Wildtype +Vehículo   | TDP43 <sup>A315T</sup> +CBDA 10     | Diferencia       | 95% I.C. diferencia | t        | P valor  | Resumen |  |
| 65  | 100,0              | 100,0                              | 0,0000     | -5.427 to 5.427     | 0,0000  | P > 0.05 | ns      | 100,0  | 100,0                               | 0,0000           | -4.741 to 4.741     | 0        | P > 0.05 | ns      |  |
| 66  | 103,8              | 102,3                              | -1,433     | -6.860 to 3.994     | 0,9846  | P > 0.05 |         | 103,8  | 105,3                               | 1,541            | -3.200 to 6.282     | 1,212    | P > 0.05 |         |  |
| 67  | 104,3              | 103,1                              | -1,156     | -6.582 to 4.271     | 0,7938  | P > 0.05 |         | 104,3  | 105,2                               | 0,9641           | -3.777 to 5.705     | 0,7580   | P > 0.05 |         |  |
| 68  | 103,9              | 102,9                              | -0,9778    | -6.405 to 4.449     | 0,6717  | P > 0.05 |         | 103,9  | 104,2                               | 0,3641           | -4.377 to 5.105     | 0,2863   | P > 0.05 |         |  |
| 69  | 104,4              | 103,1                              | -1,322     | -6.749 to 4.105     | 0,9082  | P > 0.05 |         | 104,4  | 104,5                               | 0,1051           | -4.636 to 4.846     | 0,08265  | P > 0.05 |         |  |
| 70  | 104,6              | 102,2                              | -2,378     | -7.805 to 3.049     | 1,633   | P > 0.05 |         | 104,6  | 104,8                               | 0,2462           | -4.495 to 4.988     | 0,1935   | P > 0.05 |         |  |
| 71  | 104,7              | 102,8                              | -1,922     | -7.349 to 3.505     | 1,320   | P > 0.05 |         | 104,7  | 105,2                               | 0,4538           | -4.288 to 5.195     | 0,3568   | P > 0.05 |         |  |
| 72  | 101,9              | 99,67                              | -2,233     | -7.660 to 3.194     | 1,534   | P > 0.05 |         | 101,9  | 101,5                               | -0,4385          | -5.180 to 4.303     | 0,3447   | P > 0.05 |         |  |
| 73  | 105,3              | 102,3                              | -2,933     | -8.360 to 2.494     | 2,015   | P > 0.05 |         | 105,3  | 104,2                               | -1,036           | -5.777 to 3.705     | 0,8145   | P > 0.05 |         |  |
| 74  | 105,3              | 101,2                              | -4,078     | -9.505 to 1.349     | 2,801   | P > 0.05 |         | 105,3  | 104,3                               | -0,9923          | -5.734 to 3.749     | 0,7802   | P > 0.05 |         |  |
| 75  | 106,0              | 102,2                              | -3,811     | -9.238 to 1.616     | 2,618   | P > 0.05 | 106,0   | 104,0  | -2,033                              | -6.775 to 2.708  | 1,599               | P > 0.05 |          |         |  |
| 76  | 107,4              | 102,8                              | -4,574     | -10.00 to 0.8532    | 3,142   | P < 0.05 | *       | 107,4  | 105,2                               | -2,121           | -6.862 to 2.621     | 1,667    | P > 0.05 |         |  |
| 77  | 107,6              | 102,2                              | -5,404     | -10.83 to 0.02245   | 3,712   | P<0.01   | **      | 107,6  | 104,8                               | -2,857           | -7.599 to 1.884     | 2,247    | P > 0.05 |         |  |
| 78  | 106,9              | 101,3                              | -5,598     | -11.02 to -0.1707   | 3,845   | P<0.01   | **      | 106,9  | 103,5                               | -3,393           | -8.134 to 1.349     | 2,667    | P > 0.05 |         |  |
| 79  | 103,4              | 98,56                              | -4,894     | -10.32 to 0.5331    | 3,362   | P < 0.05 | *       | 103,4  | 100,9                               | -2,526           | -7.268 to 2.215     | 1,986    | P > 0.05 |         |  |
| 80  | 106,4              | 100,8                              | -5,585     | -11.01 to -0.1578   | 3,836   | P<0.01   | **      | 106,4  | 103,6                               | -2,747           | -7.488 to 1.994     | 2,160    | P > 0.05 |         |  |
| 81  | 107,2              | 100,1                              | -7,039     | -12.47 to -1.612    | 4,835   | P<0.001  | ***     | 107,2  | 103,5                               | -3,689           | -8.430 to 1.053     | 2,900    | P > 0.05 |         |  |
| 82  | 107,1              | 99,44                              | -7,665     | -13.09 to -2.238    | 5,265   | P<0.001  |         | 107,1  | 102,6                               | -4,494           | -9.236 to 0.2470    | 3,534    | P < 0.05 |         |  |
| 83  | 107,4              | 99,11                              | -8,263     | -13.69 to -2.836    | 5,676   | P<0.001  |         | 107,4  | 102,6                               | -4,758           | -9.500 to -0.01703  | 3,741    | P<0.01   |         |  |
| 84  | 108,0              | 99,22                              | -8,774     | -14.20 to -3.347    | 6,027   | P<0.001  |         | 108,0  | 100,9                               | -7,073           | -11.81 to -2.332    | 5,561    | P<0.001  |         |  |
| 85  | 108,4              | 97,33                              | -11,07     | -16.50 to -5.647    | 7,607   | P<0.001  |         | 108,4  | 100,9                               | -7,484           | -12.23 to -2.742    | 5,884    | P<0.001  |         |  |
| 86  | 104,9              | 94,56                              | -10,38     | -15.81 to -4.952    | 7,129   | P<0.001  |         | 104,9  | 98,77                               | -6,165           | -10.91 to -1.423    | 4,847    | P<0.001  |         |  |
| 87  | 107,4              | 95,22                              | -12,21     | -17.63 to -6.779    | 8,384   | P<0.001  |         | 107,4  | 98,23                               | -9,197           | -13.94 to -4.456    | 7,231    | P<0.001  |         |  |
| 88  | 108,0              | 92,78                              | -15,20     | -20.62 to -9.769    | 10,44   | P<0.001  |         | 108,0  | 99,31                               | -8,666           | -13.41 to -3.924    | 6,813    | P<0.001  |         |  |
| 89  | 108,8              | 92,89                              | -15,92     | -21.35 to -10.49    | 10,93   | P<0.001  |         | 108,8  | 99,08                               | -9,731           | -14.47 to -4.989    | 7,651    | P<0.001  |         |  |
| Wildtype +vehículo Vs TDP43 <sup>A315T</sup> +Riluzol 10mg/kg |                    |                                    |            |                     |         |          |         | Wildtype Vs TDP43 <sup>A315T</sup> +CBDA:riluzol 10:10 mg/kg |                                     |                  |                     |          |          |         |  |
| Días  | Wildtype +vehículo | TDP43 <sup>A315T</sup> +Riluzol 10 | Diferencia | 95% I.C. diferencia | t       | P valor  | Resumen | Wildtype +vehículo   | TDP43 <sup>A315T</sup> +Combinación | Diferencia       | 95% I.C. diferencia | t        | P valor  | Resumen |  |
| 65  | 100,0              | 100,0                              | 0,0000     | -5.682 to 5.682     | 0,0000  | P > 0.05 | ns      | 100,0  | 100,0                               | 0,0000           | -5.682 to 5.682     | 0        | P > 0.05 | ns      |  |
| 66  | 103,8              | 103,9                              | 0,1083     | -5.574 to 5.790     | 0,07107 | P > 0.05 |         | 103,8  | 103,8                               | -0,01667         | -5.699 to 5.665     | 0,01094  | P > 0.05 |         |  |
| 67  | 104,3              | 103,6                              | -0,6417    | -6.324 to 5.040     | 0,4210  | P > 0.05 |         | 104,3  | 104,5                               | 0,2333           | -5.449 to 5.915     | 0,1531   | P > 0.05 |         |  |
| 68  | 103,9              | 102,4                              | -1,492     | -7.174 to 4.190     | 0,9787  | P > 0.05 |         | 103,9  | 103,8                               | -0,1167          | -5.799 to 5.565     | 0,07655  | P > 0.05 |         |  |
| 69  | 104,4              | 104,1                              | -0,3083    | -5.990 to 5.373     | 0,2023  | P > 0.05 |         | 104,4  | 104,0                               | -0,4333          | -6.115 to 5.248     | 0,2843   | P > 0.05 |         |  |
| 70  | 104,6              | 103,3                              | -1,350     | -7.032 to 4.332     | 0,8857  | P > 0.05 |         | 104,6  | 103,8                               | -0,8500          | -6.532 to 4.832     | 0,5577   | P > 0.05 |         |  |
| 71  | 104,7              | 104,6                              | -0,07500   | -5.757 to 5.607     | 0,04921 | P > 0.05 |         | 104,7  | 103,0                               | -1,700           | -7.382 to 3.982     | 1,115    | P > 0.05 |         |  |
| 72  | 101,9              | 100,5                              | -1,400     | -7.082 to 4.282     | 0,9185  | P > 0.05 |         | 101,9  | 100,0                               | -1,900           | -7.582 to 3.782     | 1,247    | P > 0.05 |         |  |
| 73  | 105,3              | 103,0                              | -2,267     | -7.949 to 3.415     | 1,487   | P > 0.05 |         | 105,3  | 102,4                               | -2,892           | -8.574 to 2.790     | 1,897    | P > 0.05 |         |  |
| 74  | 105,3              | 101,1                              | -4,175     | -9.857 to 1.507     | 2,739   | P > 0.05 |         | 105,3  | 101,8                               | -3,550           | -9.232 to 2.132     | 2,329    | P > 0.05 |         |  |
| 75  | 106,0              | 102,5                              | -3,533     | -9.215 to 2.148     | 2,318   | P > 0.05 | 106,0   | 101,3  | -4,783                              | -10.47 to 0.8985 | 3,138               | P < 0.05 |          |         |  |
| 76  | 107,4              | 103,9                              | -3,476     | -9.158 to 2.205     | 2,281   | P > 0.05 | 107,4   | 102,8  | -4,601                              | -10.28 to 1.080  | 3,019               | P > 0.05 |          |         |  |
| 77  | 107,6              | 102,8                              | -4,877     | -10.56 to 0.8051    | 3,200   | P < 0.05 | *       | 107,6  | 102,9                               | -4,752           | -10.43 to 0.9301    | 3,118    | P < 0.05 |         |  |
| 78  | 106,9              | 102,0                              | -4,931     | -10.61 to 0.7508    | 3,235   | P < 0.05 | 106,9   | 100,0  | -6,931                              | -12.61 to -1.249 | 4,547               | P<0.001  |          |         |  |
| 79  | 103,4              | 99,88                              | -3,574     | -9.256 to 2.107     | 2,345   | P > 0.05 | ns      | 103,4  | 98,88                               | -4,574           | -10.26 to 1.107     | 3,001    | P > 0.05 |         |  |
| 80  | 106,4              | 101,6                              | -4,737     | -10.42 to 0.9444    | 3,108   | P < 0.05 | *       | 106,4  | 100,1                               | -6,237           | -11.92 to -0.5556   | 4,092    | P<0.01   |         |  |
| 81  | 107,2              | 101,9                              | -5,275     | -10.96 to 0.4067    | 3,461   | P < 0.05 | 107,2   | 100,3  | -6,900                              | -12.58 to -1.218 | 4,527               | P<0.001  |          |         |  |
| 82  | 107,1              | 100,9                              | -6,235     | -11.92 to -0.5529   | 4,091   | P<0.01   | **      | 107,1  | 99,38                               | -7,735           | -13.42 to -2.053    | 5,075    | P<0.001  |         |  |
| 83  | 107,4              | 101,3                              | -6,124     | -11.81 to -0.4420   | 4,018   | P<0.01   | **      | 107,4  | 99,25                               | -8,124           | -13.81 to -2.442    | 5,330    | P<0.001  |         |  |
| 84  | 108,0              | 101,5                              | -6,496     | -12.18 to -0.8144   | 4,262   | P<0.001  | ***     | 108,0  | 98,00                               | -9,996           | -15.68 to -4.314    | 6,558    | P<0.001  |         |  |
| 85  | 108,4              | 100,8                              | -7,657     | -13.34 to -1.975    | 5,024   | P<0.001  |         | 108,4  | 97,13                               | -11,28           | -16.96 to -5.600    | 7,402    | P<0.001  |         |  |
| 86  | 104,9              | 98,25                              | -6,684     | -12.37 to -1.002    | 4,385   | P<0.001  |         | 104,9  | 95,38                               | -9,559           | -15.24 to -3.877    | 6,272    | P<0.001  |         |  |
| 87  | 107,4              | 98,25                              | -9,178     | -14.86 to -3.496    | 6,022   | P<0.001  |         | 107,4  | 95,75                               | -11,68           | -17.36 to -5.996    | 7,662    | P<0.001  |         |  |
| 88  | 108,0              | 98,88                              | -9,098     | -14.78 to -3.416    | 5,969   | P<0.001  |         | 108,0  | 96,13                               | -11,85           | -17.53 to -6.166    | 7,774    | P<0.001  |         |  |
| 89  | 108,8              | 99,88                              | -8,933     | -14.61 to -3.251    | 5,861   | P<0.001  | 108,8   | 96,13  | -12,68                              | -18.36 to -7.001 | 8,321               | P<0.001  |          |         |  |

**Tabla S4. Control de peso diario durante el periodo de tratamiento.** Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM del porcentaje de peso respecto al peso inicial de cada grupo experimental. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para valores repetidos, seguido de un test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales WT + Vehículo)

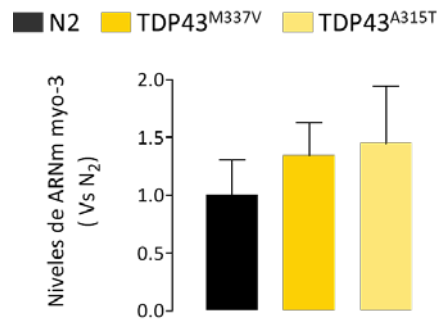


**Figura S5. Niveles de expresión de la proteína TDP43 fosforilada.** (A) Imagen representativa del Western-blot. (B) Cuantificación. Se representa la media  $\pm$  SEM de cada grupo experimental normalizada frente a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vh. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de un test de Newman Keuls. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  (\* respecto a los animales WT+vehículo; # respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+ Vh)





**Figura S6. Análisis morfológico de las células de microglía tras el tratamiento con CBDA, Riluzol y la combinación de ambos. (B)** Medida del área del soma y **(C)** la longitud de las ramificaciones de las células de microglía de la zona ventral de la médula espinal marcadas con IBA-1. **(D)** Ratio de tamaño del cuerpo celular frente a la longitud de las ramificaciones. Los valores representan la media del porcentaje de la medida de 16 células en 4 animales de cada grupo experimental  $\pm$  SEM. Se normalizaron los resultados con respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup> +vehículo. Los datos se analizaron mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales WT+vh; # respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+vh; @ respecto a los animales TDP43<sup>A315T</sup>+CBDA 10 mg/kg). **(A)** Imágenes representativas de cada grupo experimental.



**Figura S7. niveles de expresión de ARNm de myo-3 en nemátodos adultos de un día.** Los datos se representan normalizados frente a los animales N2. Los resultados se analizaron mediante el test de t de Student de una cola. (n=5).

# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

**Figura 1.** Esquema simplificado del Sistema Motor **pág. 49**

**Figura 2.** Cuidados de los pacientes con ELA **pág. 50**

**Figura 3.** Sintomatología clínica de la ELA **pág. 51**

**Figura 4.** Evolución del descubrimiento de genes relacionados con la ELA desde 1990 **pág. 54**

**Figura 5.** Esquema de la fisiopatología de la ELA y los genes implicados **pág. 59**

**Figura 6** Diferentes modelos experimentales que se utilizan en la investigación de la ELA **pág. 72**

**Figura 7.** Esquema cronológico de algunos de los usos del cannabis a lo largo de la historia hasta el descubrimiento del Sistema Cannabinoide Endógeno **pág. 76**

**Figura 8.** Esquema general del SEC. Principales vías de síntesis y degradación **pág. 77**

**Figura 9.** Localización subcelular del receptor CB<sub>1</sub> y principales vías de señalización en las que participa **pág. 79**

**Figura 10.** Estructura química de los principales ligandos endógenos del SEC y otros ligandos con cierta actividad cannabinoide endógena **pág. 85**

**Figura 11.** Potenciales dianas farmacológicas de los ligandos endógenos relacionados estructuralmente con los endocannabinoides clásicos. **Pág. 86**

**Figura 12.** Principales vías de metabolismo de los endocannabinoides **pág. 91**

**Figura 13.** Estructura química de varios derivados fitocannabinoides **pág. 103**

**Figura 14.** Procesos fisiológicos principales en los que participa el SEC, función que desempeña y áreas involucradas en SNC. Participación del SEC en otros procesos en los principales sistemas del organismo. **Pág. 108**

**Figura 15.** Principales efectos neuroprotectores del Sistema Cannabinoide Endógeno. **Pág. 110**

**Figura 16.** Principales efectos neuroprotectores derivados de la activación de los receptores CB<sub>2</sub>. **Pág. 112**

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Figura 17.** Esquema general del procedimiento llevado a cabo durante los tratamientos farmacológicos desarrollados en esta Tesis Doctoral. **pág. 132**

**Figura 18.** Esquema general de la caracterización del modelo murino de ELA carente del receptor CB<sub>2</sub>. **Pág. 133**

**Figura 19.** Esquema general del procedimiento para determinar el potencial antiinflamatorio de los tratamientos frente a la respuesta inflamatoria de los astrocitos. **pág. 135**

**Figura 20.** Esquema general del procedimiento para determinar el potencial antiinflamatorio del CBDA frente a la respuesta inflamatoria glial. **Pág. 135**

**Figura 21.** Esquema general de la estimulación de la línea celular de microglía de ratón BV2. **Pág. 136**

**Figura 22.** Esquema general de la obtención de muestras para el análisis de marcadores moleculares a las diferentes etapas de desarrollo seleccionadas. **pág. 139**

**Figura 23.** Esquema general del tratamiento farmacológico con AEA. **Pág. 140**

**Figura 24.** Muestra de gel de genotipado colonia TDP43. **Pág. 143**

**Figura 25.** Test de Rotarod **pág. 145**

**Figura 26.** Evaluación del reflejo del clasp en las extremidades posteriores. **pág. 146**

**Figura 27.** Esquema de la sección lumbar L4 de la médula espinal del ratón adulto **pág. 148**

**Figura 28.** Esquema de aislamiento de astrocitos y microglía procedente de cultivos primarios de ratón. **Pág. 155**

**Figura 29.** Selección de poblaciones celulares CD11b. **pág. 156**

**Figura 30.** Esquema explicativo del diseño de Primers de genotipado. **Pág. 158**

**Figura 31.** Muestra representativa del gel de genotipado de las cepas de nemátodo. **Pág. 158**

## **RESULTADOS**

### Diseño Experimental 1

**Figura 32.** Control de ganancia de peso diaria durante el periodo de tratamiento **Pág. 170**

**Figura 33.** El tratamiento con HU308 retrasa la aparición de distonía y espasticidad en los animales TDP43<sup>A315T</sup>. **Pág.171**

**Figura 34.** La activación farmacológica del receptor CB<sub>2</sub> previene la pérdida de MN. **Pág. 172**

**Figura 35.** La activación farmacológica del receptor CB<sub>2</sub> atenúa la activación microglial en la médula espinal. **Pág. 173**

**Figura 36.** La administración crónica de HU308 redirige el cambio morfológico de las células de microglía hacia morfología de tipo ramificada. **Pág. 174**

**Figura 37.** La activación farmacológica del receptor CB<sub>2</sub> no reduce la astrogliosis observada en la médula espinal de los ratones TDP43<sup>A315T</sup>. **Pág.175**

**Figura 38.** Análisis de los niveles de marcadores inflamatorios tras la administración crónica de HU308. **Pág. 176**

**Figura 39.** El AM630 no alteró la ganancia de peso de los animales durante el periodo de tratamiento **Pág. 177**

**Figura 40.** El bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> acelera y agrava la aparición de los síntomas motores. **Pág. 178**

**Figura 41.** El bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> no altera la pérdida de MN en la médula espinal. **Pág. 179**

**Figura 42.** La administración crónica de AM630 atenúa parcialmente la activación microglial en la médula espinal. **Pág. 180**

**Figura 43.** El bloqueo farmacológico del receptor CB<sub>2</sub> no altera los niveles de astrogliosis en la médula espinal. **Pág. 180**

**Figura 44.** La ausencia del receptor CB<sub>2</sub> tiene un efecto en el peso corporal de los animales. **Pág.181**

**Figura 45.** La ausencia del receptor CB<sub>2</sub> no ejerce ningún efecto en la ganancia de peso de los animales una vez alcanzada la edad adulta. **Pág. 182**

**Figura 46.** La ausencia del receptor CB<sub>2</sub> en nuestro modelo experimental de ELA precipita la aparición de síntomas motores y reduce la supervivencia en estos animales. **Pág. 183**

**Figura 47.** La ausencia del receptor CB<sub>2</sub> en los ratones TDP43<sup>A315T</sup> acelera la muerte de las MN **pág. 184**

**Figura 48.** La ausencia del receptor CB<sub>2</sub> en los ratones TDP43<sup>A315T</sup> reduce el número de MN positivas para ChAT. **Pág. 185**

**Figura 49.** La delección del receptor CB<sub>2</sub> acelera los procesos de microgliosis en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>. **Pág. 186**

**Figura 50.** La delección del receptor CB<sub>2</sub> acelera los procesos de activación astrocitaria en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>. **Pág. 187**

**Figura 51.** La delección del receptor CB<sub>2</sub> no modifica el patrón de expresión de citoquinas proinflamatorias en los ratones TDP43<sup>A315T</sup>. **Pág. 189**

### Diseño Experimental 2

**Figura 52.** Efecto de la administración crónica con  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCV, (E)-BCP, CBD, CBDA y CBDV en el peso de los animales TDP43<sup>A315T</sup>. **pág. 192**

**Figura 53.** La administración crónica de  $\Delta^9$ -THCV y (E)-BCP, CBDA retrasa la aparición de síntomas motores en los animales TDP43. **Pág 193**

**Figura 54.** La administración crónica de CBDA retrasa la aparición del reflejo de clasping en los animales TDP43. **Pág. 194**

**Figura 55.** El tratamiento crónico con CBD, CBDV y CBDA previene la muerte de las MN en los animales TDP43 **pág. 195**

**Figura 56.** La administración crónica de  $\Delta^9$ -THCV, CBDA y CBDV modifica la morfología de las células de microglía **pág 196**

**Figura 57.** Cuantificación de la densidad de marcaje de inmunofluorescencia para GFAP. **pág. 197**

**Figura 58.** Niveles de expresión de ARNm en la zona ventral de la médula espinal. **pág. 198**

**Figura 59.** El fitocannabinoides CBDA a 10mg/kg muestra un fuerte potencial antioxidante **pág. 200**

**Figura 60.** La administración crónica con el fitocannabinoides CBDA produce una polarización de la microglía hacia fenotipos antiinflamatorios **pág. 200**

**Figura 61.** Los animales TDP43<sup>A315T</sup> no presentan alteraciones estructurales y metabólicas aparentes. **Pág. 201**

**Figura 6294.** Evaluación del potencial antiinflamatorio de los fitocannabinoides  $\Delta^9$ -THCV y CBDA en cultivos primarios de astrocitos transgénicos. **Pág. 202**

**Figura 63.** Efecto de la administración de CBDA en cultivos de células de microglía TDP43A315T estimulada con LPS sobre la capacidad de estas células de estimular la respuesta proinflamatoria en cultivos de astrocitos **pág. 204**

**Figura 64.** La administración con CBDA a las células de microglía reduce los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en una manera dosis dependiente **pág. 206**

**Figura 65.** El bloqueo simultáneo de los receptores CB $_2$  y PPAR $\gamma$  en las células de microglía potencia los efectos antiinflamatorios del fitocannabinoide **pág. 207**

#### Diseño Experimental 3

**Figura 66.** Control de peso diario durante el tratamiento farmacológico **pág. 209**

**Figura 67.** La administración farmacológica de CBDA 10mg/kg retrasa la disfunción motora en los animales TDP43<sup>A315T</sup> mientras que ninguna dosis de Riluzol modificó la progresión de la enfermedad **pág. 210**

**Figura 68.** Evaluación de la funcionalidad motora durante el tratamiento farmacológico **pág. 211**

**Figura 69.** La administración de 10 mg/kg de CBDA incrementa la supervivencia de las MNs espinales en los animales TDP43<sup>A315T</sup>. Marcaje de MNs **pág. 212**

**Figura 70.** El tratamiento con CBDA a 1 y 10 mg/kg reduce parcialmente la microgliosis presente en la médula espinal de los ratones TDP43<sup>A315T</sup> **pág. 214**

**Figura 71.** Análisis morfológico de las células de microglía **pág. 215**

**Figura 72.** Ningún tratamiento farmacológico moduló positivamente la astrogliosis observada en los ratones **pág. 216**

**Figura 73.** Estudio del efecto del tratamiento con CBDA y Riluzol, solos o en combinación sobre la ganancia de peso corporal de los animales TDP43<sup>A315T</sup>. **pág. 217**

**Figura 74.** Efectos funcionales de la administración de CBDA (10mg/kg), Riluzol (10mg/kg) y la combinación de ambos compuestos a los animales TDP43<sup>A315T</sup>. **pág. 218**

**Figura 75.** Efectos de la administración de CBDA (10mg/kg), Riluzol (10mg/kg) y la combinación de ambos compuestos en la supervivencia de las MNs. **pág. 219**

**Figura 76.** Efecto tras la administración de CBDA (10mg/kg) Riluzol (10mg/kg) o la combinación de ambos compuestos en la activación microglial de los animales TDP43<sup>A315T</sup>. **pág. 220**

**Figura 77.** Efecto sobre la astrogliosis de la administración de CBDA (10mg/kg), e Riluzol (10mg/kg) o la combinación de ambos compuestos a los animales TDP43<sup>A315T</sup>. **pág. 221**

#### Diseño Experimental 4

**Figura 78.** Déficit motor en los nemátodos que presentan la inserción de la TDP43 humana mutada. **Pág. 224**

**Figura 79.** Micrografías in vivo de la pared muscular de los nemátodos **pág. 225**

**Figura 80.** Disfunción de la recaptura de acetilcolina en el estadio adulto de los nemátodos TDP43<sup>A315T</sup> y TDP43<sup>M337V</sup>. **pág. 227**

**Figura 81.** Desregulación de marcadores estructurales del músculo esquelético de los nemátodos modelo de ELA. **Pág. 228**

**Figura 82.** Evaluación de los niveles de receptores celulares relacionados con el SSEC en el nemátodo *C. elegans*. **pág. 229**

**Figura 83.** Otros receptores activados por cannabinoides. **Pág. 230**

**Figura 84.** Análisis de los niveles de expresión de los principales elementos relacionados con la maquinaria metabólica del SSEC en estadio adulto. **Pág. 232**

**Figura 85.** Análisis de los elementos del sistema serotoninérgico. **Pág. 233**

**Figura 86.** Efecto en la locomoción del tratamiento con AEA en los animales N2. **Pág. 234**

**Figura 87.** Efecto en la locomoción del tratamiento con AEA en los animales TDP43<sup>A315T</sup>. **pág. 234**

**Figura 88.** Efecto en la locomoción del tratamiento con AEA en los animales TDP43<sup>M337V</sup>. **pág. 235**

**Figura 89.** Efecto en la locomoción del tratamiento con AEA en los animales TDP43<sup>M337V</sup>;npr-19<sup>-/-</sup>. **Pág. 236**

**Figura 90.** Efecto en la locomoción del tratamiento con AEA en los animales TDP43<sup>M337V</sup>;ser-4<sup>-/-</sup>. **Pág. 236**

## DISCUSIÓN

**Figura 91.** Mecanismo de neuroprotección compensatoria propuesto en el modelo de TDP43<sup>A315T</sup>. **Pág. 246**

**Figura 92.** Efecto de la modulación terapéutica de la microglía en la progresión de la ELA. **Pág. 256**

**Figura 93.** Esquema simplificado de la unión Neuromuscular en el nemátodo *C. elegans*. Principales funciones del DGC **Pág. 259**

# ÍNDICE DE CUADROS

**Cuadro 1.** Criterios diagnósticos para la ELA de El Escorial y Airlie House. **pág. 52**

**Cuadro 2.** Proteína TDP43 **pág. 56**

**Cuadro 3.** ELA y DFT, los dos extremos de un espectro **pág. 57**

**Cuadro 4.** El astrocito en la ELA **pág. 64**

**Cuadro 5.** Microglía en la ELA **pág. 66**

**Cuadro 6.** El oligodendrocito en la ELA **pág. 70**

**Cuadro 7.** Oligomerización de los receptores cannabinoides **pág. 81**

**Cuadro 8.** Vías de señalización acopladas a los receptores cannabinoides **pág. 87**

**Cuadro 9.** Cannabinoides sintéticos. Herramientas esenciales para el estudio de los receptores cannabinoides en procesos biológicos y en patología **pág. 99**

**Cuadro 10.** SEC y su implicación en la modulación de la transmisión nerviosa **pág. 107**

# ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Otros genes implicados en la patología de la ELA **pág. 58**

**Tabla 2.** Ejemplos de moduladores del metabolismo o la señalización endocannabinoide, naturales o sintéticos **pág. 95**

**Tabla 3** Potencial terapéutico de los derivados botánicos del *C. sativa* para su aplicación en la ELA **pág. 105**

**Tabla 4** Aplicación de cannabinoides en el tratamiento de enfermedades **pág. 109**

**Tabla 5.** Listado de compuestos testados en ensayos clínicos con potencial utilidad para el tratamiento de la ELA **pág. 115**

**Tabla 6.** Principales ensayos preclínicos con cannabinoides en modelos de ELA. **Pág. 119**

**Tabla 7.** Cepas de nemátodo utilizadas en el diseño experimental 4. **Pág. 140**

**Tabla 8.** Relación de primers utilizados para el proceso de genotipado de nuestras colonias de ratón. **Pág. 143**

**Tabla 9.** Relación de compuestos utilizados para los tratamientos farmacológicos en el modelo experimental murino TDP43<sup>A315T</sup> **Pág. 144**

**Tabla 10.** Relación de compuestos utilizados para los tratamientos farmacológicos en los modelos celulares **Pág. 144**

**Tabla 11.** Anticuerpos utilizados para las técnicas de inmunofluorescencia de los experimentos in vivo **Pág. 150**

**Tabla 12.** Anticuerpos utilizados para las técnicas de inmunofluorescencia de los experimentos in vitro **Pág. 150**

**Tabla 13.** Relación de genes analizados en las muestras de ratón. **Pág. 152**

**Tabla 14.** Anticuerpos utilizados en citometría de flujo. **Pág. 156**

**tabla 15.** Cepas de *C. elegans* utilizadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. **Pág. 157**

**Tabla 16.** Secuencias de los primers utilizados para el genotipado de las cepas dobles mutantes de nemátodo **Pág. 159**

**Tabla 17.** Genes estudiados en los modelos experimentales de *C. elegans* **Pág. 161**

**Tabla 18.** Evaluación de los niveles de marcadores de funcionalidad muscular en el nemátodo *C. elegans* en la etapa de desarrollo larva L2-L3 **Pág. 226.**

**Tabla 19.** Evaluación de los niveles de receptores celulares relacionados con el SSEC en el nemátodo *C. elegans* en la etapa de desarrollo larva L2-L3. **Pág. 229**

**Tabla 20.** Evaluación de los niveles de otros receptores celulares relacionados con el SSEC en el nemátodo *C. elegans* en la etapa de desarrollo larva L2-L3 **pág. 230**

**Tabla 21** Análisis de la maquinaria metabólica del SEC en etapas de desarrollo larva L2-L3 **Pág. 231**



Hay que parar para seguir, y aprender a detenerse en movimiento.

Estefanía S. Vasconcellos. *No me daba tiempo.*